

**IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN PLAZENTA - UND LUNGENKARZINOM -
ISOFERRITINEN UNTER VERWENDUNG
VON HPLC - ANIONENAUSTAUSCHER -
CHROMATOGRAPHIE UND SEQUENZIELLER
IMMUNABSORPTION**

WOLFGANG HELL

1987

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Klinik II
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. G. Paumgartner

**IMMUNOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN PLAZENTA - UND LUNGENKARZINOM -
ISO-FERRITINEN UNTER VERWENDUNG
VON HPLC - ANIONENAUSTAUSCHER -
CHROMATOGRAPHIE UND SEQUENZIELLER
IMMUNABSORPTION**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Hell

aus

Marktoberdorf

1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. R. Lamerz

Mitberichterstatter : Prof. Dr. G. Paumgartner
Prof. Dr. E.-P. Rieber

Dekan : Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 30.4.87

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	HAUPTTEIL	3
2.1	Fremduntersuchungen über Ferritin	3
2.1.1	Struktur	3
2.1.2	Eisenaufnahme ins Molekül	4
2.1.3	Physikalisch-chemische Eigenschaften	6
2.1.4	Isoferritine und ihre immunologische Heterogenität	11
2.1.5	Vorkommen	16
2.1.6	Biosynthese und Abbau	20
2.1.7	Physiologische Bedeutung	22
2.1.8	Ätiologie veränderter Serumspiegel	23
2.1.9	Isolierung aus Gewebe bzw. Serum	25
2.1.10	Bestimmung von Ferritin	27
2.1.10.1	Qualitative bzw. halbquantitative Bestimmung von Ferritin	27
2.1.10.2	Quantitative Bestimmung von Ferritin	28
2.1.11	Klinische Bedeutung der Ferritinbestimmung im Serum	30
2.1.11.1	Normalwerte	30
2.1.11.2	Nichtmaligne Erkrankungen	37
2.1.11.3	Maligne Erkrankungen	43
2.2	Eigene Untersuchungen	56
2.2.1	Methodik	56
2.2.1.1	Analytische Verfahren	56
	Gesamt-Eiweiß	56
	Zweidimensionale Doppeldiffusion (OUCHTERLONY)	56

Qualitative Polyacrylamidgel-Isoelektrofo-	56
kussierung	
Radioimmunoassay	57
Markierung und Reinigung des markierten	
Proteins	57
Testung des ersten Antikörpers (Antikör-	
perverdünnungsreihe)	59
Durchführung des Radioimmunoassays	61
2.2.1.2 Präparative Verfahren	62
Gewebeextraktion	62
Plazenta	62
Lungenkarzinom	63
Säulenchromatographie	64
Gelfiltration	64
DEAE-Anionenaustauschchromatographie	64
Affinitätschromatographie	65
Zentrifugation	67
Dialyse	67
Konzentrierung	67
Enteisen	68
Lagerung	68
2.2.1.3 Herstellung der Antiseren	69
Immunisierung	69
Absorption und Reinigung	70
Immunad/desorptionsstudien	70
2.2.1.4 Berechnungen	71
Markierung	71
Antikörperverdünnungsreihe und RIA	71
Statistische Berechnungen	72
2.2.2 Materialien und Patientengut	73
2.2.2.1 Material	73
Extrahierte Gewebe	73
Antiseren	73
RIA-Standards	73
2.2.2.2 Patientengut	74
Normalkollektiv	74
Patienten mit nichtmalignen Erkrankungen	74
Patienten mit malignen Erkrankungen	74
2.2.3 Eigene Ergebnisse	74

2.2.3.1	Methodischer Teil	74
	Gewebeextraktion	74
	Reinigung des Antigens	76
	Herstellung der Antiseren	78
	Immunad/desorptionsstudien	78
	Radioimmunoassay	79
	Markierung und Reinigung des markier-	
	ten Antigens	79
	Antikörperverdünnungskurve	80
	Standardkurve	81
	Haltbarkeit	86
2.2.3.2	Serumferritin-Bestimmung bei Normal-	
	und Patientenkollektiven	86
2.2.4	Diskussion	83
2.2.4.1	Methodischer Teil	88
	Gewebeextraktion und Reinigung des Antigens	88
	Herstellung der Antiseren	92
	Immunad/desorptionsstudien	93
	Radioimmunoassay	95
	Markierung und Reinigung des markierten	
	Antigens	95
	Antikörperverdünnungskurve	96
	Standardinhibitionskurve und Testansatz	97
2.2.4.2	Serumferritin-Bestimmung bei Normal-	
	und Patientenkollektiven	99
2.2.5	Illustrationsmaterial zum Abschnitt	
	"2.2 Eigene Untersuchungen"	101
2.2.5.1	Abbildungen	101
2.2.5.2	Tabellen	138
3.	Z U S A M M E N F A S S U N G	147
4.	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	150

1. E I N L E I T U N G

Ferritin, das im Hinblick auf seine Kapazität bedeutendste eisenspeichernde Protein menschlicher und tierischer Organismen, wurde erstmals von LAUFBERGER (173) aus Pferdemicke isoliert. Bis vor wenigen Jahren galt das Ferritin als ein ausschließlich intrazelluläres Protein, welches nur unter pathologischen Bedingungen wie Gewebsnekrosen (z.B. Hepatitis) ins Blut freigesetzt wird (247). Erst 1972 konnte mit Hilfe der von ADDISON et al. (1) zur Ferritinbestimmung eingeführten, hochempfindlichen radioimmunologischen Nachweismethode das Vorkommen von Ferritin im Nanogrammbereich pro Milliliter im Serum von Gesunden, wie auch von Patienten mit Eisenmangel bewiesen werden. Inzwischen hat die radioimmunologische Bestimmung von Serumferritin als zuverlässige und nichtinvasive Methode in der Diagnostik und Therapieüberwachung bei Patienten mit Eisenmangelzuständen eine große klinische Bedeutung erlangt (143, 150, 216).

Zunehmend Interesse erregen die Ferritine jedoch im Rahmen der Tumorummunologie. Seit 1965, den ersten vergleichenden Betrachtungen an Ferritin aus neoplastischen und nichtneoplastischen menschlichen Zellen durch RICHTER (248), wurden oftmals Versuche angestellt, immunologische Unterschiede zwischen normalem Ferritin und den postulierten Tumorferritinen aufzudecken und diagnostisch zu verwerten. 1966 entdeckten BUFFE und RIMBAUT (51) in fetaler menschlicher Leber ein Antigen, das sie als α_2 -H Globulin bezeichneten. Dieses war ein 17 S eisenspeicherndes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht um 600.000, das eine elektrophoretische α_2 -Beweglichkeit besaß und sehr hitzestabil war. Besondere Bedeutung erlangte es durch seinen Nachweis in Seren von Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen (51).

Heute gilt das α_2 -H Globulin trotz gewisser physikochemischer Unterschiede als Isoferritin, nachdem spätere immunologische Untersuchungen seine immunologische Identität mit Ferritin erbracht hatten. Ein Zusammenhang mit malignen Erkrankungen wird besonders bei den sogenannten sauren Ferritinen vermutet (4, 8, 53, 122, 147).

Neben einer ausführlichen Übersicht über die physikochemischen Eigenschaften, Präparation und klinische Bedeutung von Ferritin waren die Ziele der vorliegenden Arbeit:

1. Die Entwicklung einer schonenden Präparationsmethode zur möglichst vollständigen Gewinnung hochgereinigten Ferritins aus Plazenta- und Lungenkarzinomgewebe unter Verzicht auf bisher übliche, potentiell oder gesichert proteinschädigend wirkende Fällungsschritte;
2. eine quantitative Trennung der Isoferritinspektren in Anteile sauren, mittleren und alkalischen Ferritins;
3. a) die Herstellung polyklonaler Antiseren gegen die gewonnenen sauren bzw. alkalischen Ferritinanteile und anschließende Prüfung auf Spezifität der Antikörper in Bezug auf verschiedene Ferritinfraktionen;
b) die Untersuchung der Antiseren auf die Möglichkeit einer Steigerung ihrer Spezifität für saure bzw. alkalische Ferritine durch kreuzweise Immunad/desorption an Chromatographiesäulen mit kovalent gebundenen sauren bzw. alkalischen Ferritinfraktionen und
4. die Entwicklung eines eigenen hochempfindlichen Ferritin-Radioimmunoassays mit anschließender Testung an einigen ausgewählten Patientenkollektiven.

2. H A U P T T E I L

2.1 Fremduntersuchungen über Ferritin

2.1.1 Struktur

Das Apoferritin, welches nach MUNRO und LINDER (208), ADELMAN und DRYSDALE (3) sowie anderen Autoren (118, 250, 253, 280) ein Molekulargewicht zwischen 430.000 und 490.000, nach anderen Untersuchern (46, 87, 119, 246, 297) zwischen 440.000 und 460.000 besitzt, stellt sich als eine Hohlkugel mit einem Innendurchmesser von 70 - 80 Å, (261) einem Aussendurchmesser von 120 - 130 Å (261) und einer Wandstärke von 25 Å dar (119, 208, 209, 212). Die Aufnahme und Abgabe von Eisen erfolgt durch sechs die Proteinhülle durchbohrende, 10 Å breite Kanäle (208) wobei das Molekulargewicht nach Speicherung von maximal 4300 - 5000 Eisenionen in Form von Eisen (III)-oxidhydroxidphosphat $(\text{FeOOH})_8 \cdot (\text{FeO} \cdot \text{PO}_3\text{H}_2)$ bis auf 900.000 ansteigen kann (46, 87, 185, 208, 297).

Die Proteinhülle des Apoferritins besteht aus 24 zu einem pentagonalen Dodekahedron (297) geordneten und von starken Kräften elektrostatischer Natur zusammengehaltenen (289) Untereinheiten ("Subunits"), welche nach einigen Autoren weitgehend identisch und von einem Molekulargewicht je nach Untersucher zwischen 18.000 und 19.500 sind (49, 119, 246), nach Meinung anderer sich jedoch in eine Gruppe der "L"-Untereinheiten ("Light-Subunits") mit einem Molekulargewicht von 19.000 und in eine Gruppe der "H"-Untereinheiten ("Heavy-Subunits") mit einem Molekulargewicht von 21.000 gliedern (3, 9, 166, 223). Von CRAGG (69, 293) wird im Serum-Ferritin neben den zwei Untereinheiten H und L noch eine weitere "G"-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 23.000 beschrieben, wobei es sich bei dieser um eine Sialinsäure-glykosylierte L-Untereinheit handeln soll. Eine Glykosylierung von Serumferritin gegenüber Organferritin wurde auch von anderen Autoren (63, 67, 207, 292)

aufgrund des Bindungsverhaltens der verschiedenen Ferritine an Concanavalin A postuliert.

Jede Untereinheit ist aus vier langen alpha-Helices (35-42 Å) und einer kurzen Helix zusammengesetzt, welche annähernd einen Zylinder von 27 Å Durchmesser und 55 Å Länge bilden (2, 208).

Aminosäuresequenzanalysen der Untereinheiten von Apoferritin aus humaner Milz, Pferd milz, Rattenleber und humaner Leber (2), Kaninchenleber (96) sowie Organen der verschiedenen Species Meerschweinchen, Frosch und Fisch (208) ergaben nur geringe Unterschiede; die Aminosäuren Aspartat, Glutamat und Leucin waren jedoch übereinstimmend am stärksten vertreten (9, 87, 119).

Ferritinmoleküle besitzen eine Tendenz zur Bildung relativ stabiler Di-, Tri- und Oligomere (87, 119, 191, 297), welche nach Untersuchungen von Konijn et al. (166) um so ausgeprägter auftritt, je saurer die jeweiligen Isoferritine sind.

2.1.2 Eisenaufnahme ins Molekül

Die zentrale Bedeutung des Ferritins im Eisenhaushalt des Organismus (siehe 2.1.7) ist durch die Möglichkeit der Eisenspeicherung gegeben. Durch die o.g. Kanäle in der Proteinhülle können Ferro-Ionen (Fe^{2+}) in den Hohlraum des Moleküls eintreten (185), wo sie nach Oxidation zu Ferri-Ionen (Fe^{3+}) zusammen mit Phosphationen zu einem Eisen(III)oxidhydroxidphosphat-Mikrokristall aggregieren, welcher aufgrund seiner Größe nicht mehr durch die Kanäle entweichen kann (185, 209).

Nach heutiger Auffassung ist das Apoferritin als Enzym anzusehen, welches in Gegenwart eines Oxidationsmittels (z.B. O_2) zur Umwandlung von Fe^{2+} in Fe^{3+} beiträgt (185):



Für die katalytische Aktivität werden bestimmte Aminosäurereste (u.a. Histidin) innerhalb der Kanäle, bzw. auf der Innenseite der Proteinhülle verantwortlich gemacht (208, 289). Dieser Vorgang kann in einem Modell dargestellt werden:

MODELL DER EISENAUFNAHME IN FERRITIN

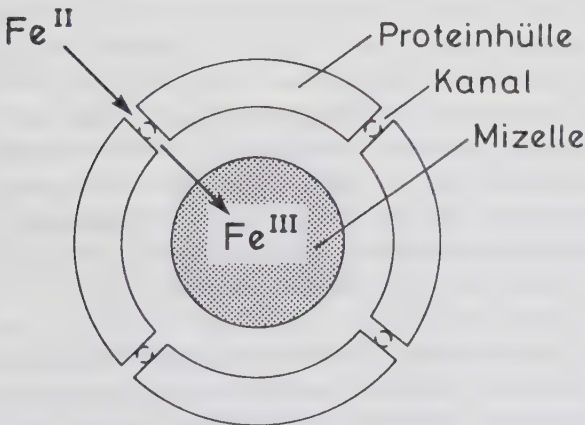


Abb.1: modifiziert nach MACARA et al. (185)
Schnitt durch ein Ferritinmolekül. Beim Durchtritt durch die Kanäle werden die $Fe(II)$ -Ionen an den aktiven Zentren zu $Fe(III)$ -Ionen oxidiert, welche dann im Hohlraum des Apoferritins zusammen mit Phosphationen (nicht dargestellt) einen Mikrokristall (Mizelle) aus Eisen (III)-oxidhydroxidphosphat bilden.

Die in vivo - Mobilisation von Eisen aus Ferritin ist auf dem gleichen Weg - unter Anwesenheit physiologischer Reduktionsmittel (119) - vorstellbar. Die Einzelheiten dieses Vorganges sind allerdings noch ungeklärt; es gibt sowohl Hinweise für die Beteiligung von Xanthin-Oxidase als auch eines spezifischen Enzyms (289). BOYER und SCHORI (39) zufolge können Ferri-Ionen (Fe^{3+}) auch direkt von Coeruloplasmin an Apoferritin abgegeben werden.

2.1.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Ferritin, ein wasserlösliches Protein, stellt sich in eisenhaltigem Zustand von rotbrauner Farbe (119, 185, 289), als Apoferritin - nach Reduktion und Entfernung des Eisens - jedoch farblos dar (289).

Das Makromolekül gilt gegenüber anderen Proteinen als außerordentlich hitzestabil, welches - aufgrund seiner komplexen Struktur - in wässriger Lösung zehn Minuten bei 80°C unbeschadet übersteht (88, 255). Neuere Untersuchungen an Kaninchenleber-Ferritin sprechen jedoch für eine stärkere Hitzeempfindlichkeit der H-Untereinheit gegenüber der L-Untereinheit (96). Nach FRENKEL et al. (96) tritt bereits bei zehnminütiger Hitze von 75°C im Molekül eine Änderung des Gehalts an Aminosäuren, insbesondere Valin, Isoleucin und Histidin ein. Hitzebehandeltes Kaninchenleberferritin besitzt im Plasma von Kaninchen eine wesentlich kürzere Halbwertszeit als nicht erhitztes Ferritin (95). Durch Kochen wird das Molekül zerstört (195, 197).

Reines Ferritin wird auch (nach eigener Beobachtung besonders in höheren Konzentrationen) durch Einfrieren und Auftauen zerstört (195, 197), während Ferritin in Serumproben bei -20°C mindestens ein Jahr haltbar ist (288) und auch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen ohne Verlust seiner immunologischen Eigen-

schaften übersteht (28). Strukturänderungen treten ebenfalls nach Trocknung und Rehydrierung (195, 197) sowie nach stärkerer Ultrabeschallung (197) auf.

Ferritin ist stabil in 10 M Harnstofflösung bei neutralem pH (119, 174), dissoziiert aber in 7-9 M Harnstofflösung (zehnminütige Inkubation, Raumtemperatur) bei pH 2,5 (9, 174, 221, 222) sowie in 67% Essigsäure (9), in 0,25% - 2,3% Natriumdodecylsulfatlösung bei pH 6,8 - 8 und 60-100°C (9, 119, 249) und in 7 M Guanidiniumchlorid bei pH 4,5 (119) in seine Untereinheiten.

Bei Verlassen dieser Extrembedingungen kommt es zur Wiedervereinigung ("Reassembly") der Untereinheiten zum vollständigen Ferritinmolekül (223), was gegen kovalente Bindungen zwischen den einzelnen Untereinheiten spricht.

Ferritin läßt sich in 30% Ammoniumsulfatlösung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ reversibel ausfällen (66, 111, 185); es kristallisiert ebenfalls reversibel in 5% Cadmiumsulfatlösung (66, 249) sowie in 15%-20% Polyethylenglykollösung (11,36). Eine von Cadmiumsulfat ausgehende geringfügige Strukturveränderung des Proteins wird diskutiert (123).

Ferritin stellt ein Glykoprotein dar; der Kohlehydratgehalt des Apoferritins aus Leber und Milz, sowohl vom Menschen als auch vom Pferd, beträgt etwa 2,4%, aus menschlichem Herzgewebe das Doppelte. Bei der Untersuchung von Organferritin (aus Pferdemilz) fand man Hexose, Fucose und Hexosamin (208).

Humanes Serumferritin adsorbiert zu 50% - 80% an das mit Sepharose 4B gekoppelte Lecitin Concanavalin A (27, 60, 207), Organferritin jedoch nur zu höchstens 10% - 20% (27). Dabei gilt der Anteil des Con A-bindenden Ferritins am Gesamtferritin als Parameter für den Anteil des glykosylierten Ferritins. Nach WORWOOD (292) und CRAGG et al. (69) weisen die sauren Anteile des Serumferritins die beste Con A-Bindung auf. In den

Seren sowohl eines Patienten mit Transfusionssiderose (60) als auch eines Patienten mit Nierenkarzinom (207), ist eine Verminderung des Con A bindenden Anteils an Ferritin festgestellt worden. Durch Behandlung von Serumferritin mit Neuraminidase wird Sialinsäure abgespalten (69), dabei verschwinden die sauersten Anteile des Serumferritins (69). Einer Untersuchung am Menschen zufolge besitzt der Con A - bindende Anteil des Serumferritins gegenüber dem nicht Con A - bindenden Anteil eine langsamere Clearance, d.h. eine höhere Plasmahalbwertszeit (27 - 30 Stunden) (293).

Der Sedimentationskoeffizient des Apoferritins beträgt je nach Autor 17 - 18,5 S (177, 191), des HoloFerritins in vollbeladenem Zustand 24 S (208), anderen Autoren zufolge je nach Menge des gespeicherten Eisens 60 - 80 S (177, 191), des eisenfreien Dimers und Trimers 24 S und 33 S (191), der Untereinheiten 2-3 S (289). Die magnetische Induktion beträgt 3,8 μB (87, 134).

Die zusammen mit Phosphat in Form von Eisenoxidhydroxidphosphat gespeicherten dreiwertigen Eisenionen lassen sich durch geeignete Reduktionsmittel in zweiwertige Ionen überführen und aus dem Protein entfernen. Langsam wirkende biologische Reduktionsmittel sind Ascorbinsäure, Glutaminsäure, Cystein, NADH, FADH_2 , FMNH_2 und reduziertes Riboflavin (119, 208, 289); stark reduzierend wirkt Dithionit (80, 87, 137, 185, 191, 282, 283). Ferritineisen läßt sich auch mit alleiniger Hilfe von spezifischen Komplexbildnern mobilisieren; hierzu zählen EDTA, o-Phenanthrolen (208), Desferrioxamin (119), 2,2-Bipyridyl (80) und die bakteriellen Eisenträger Desferrichrom, Desferrichrom A und Enterobactin (273).

Für in vitro-Experimente wird neben Dithionit die sowohl reduzierende als auch komplexbildende Thioglykolsäure am häufigsten verwandt (50, 87, 119, 177, 219).

Das im Molekül enthaltene Phosphat (1-1,5%) wird durch Behandlung mit verdünnter Lauge entfernt (209).

Außer Eisen kann das Ferritin auch größere Mengen an zweiwertigen Kupfer-, Blei-, Cadmium- (241) und Berylliumionen (242) speichern.

In der Karton-Elektrophorese wandert das Ferritin im Bereich zwischen Albumin und β -Globulinen, in Lungencarcinomextrakt besitzt die Hauptferritinfraktion α -2- β -Beweglichkeit (171). In der Polyacrylamidgelelektrophorese wird die Hauptbande vom Monomer gebildet, andere langsamere Banden von den Di-, Tri- und Oligomeren (119, 208). Bei gleichbleibender Gelkonzentration ist eine Unterscheidung der Ferritine aus verschiedenen Organen, bzw. verschiedenen Ferritinen aus gleichen Organen anhand der Wanderungsgeschwindigkeit möglich (77). In der SDS (Natriumdodecylsulfat)-Gelelektrophorese erfolgt eine Auftrennung der Untereinheiten (10).

Dem Grad der Eisenbeladung wird bezüglich des elektrophoretischen Verhaltens von ISHITANI et al. (136) keine Bedeutung zugemessen, nach Versuchen von LINDER et al. (177) an Ferritin aus menschlichem Herz jedoch gewann eine bestimmte Ferritinfraktion nach Eisenentfernung eine erhöhte Mobilität. MASSOVER (196) fand bei der Analyse von Mäuseleberferritin mittels Polyacrylamidelektrophorese fünf Banden monomerer Ferritine, sog. Isoferritine.

Bezüglich der Darstellung von Isoferritinen gewinnt die rein nach Ladung auftrennende Isoelektrofokussierung gegenüber der zusätzlich nach Größe und Form auftrennenden Elektrophorese (275) größere Bedeutung; so konnten HANCOCK et al. (116) beim Vergleich von normaler humaner Milz und Hodgkin-Milz zwar elektrophoretische Identität, jedoch bei der Polyacrylamidgel-Isoelektrofokussierung zusätzlich saurere Banden von Ferritin in der Hodgkin-Milz finden, ebenso in fetaler Leber und einem Adenokarzinom der Leber.

Isoelektrische Punkte verschiedener humaner Ferritine

<u>Herkunft</u>	<u>Isoelektrische Punkte (pI)</u>	<u>Referenz</u>
Serum:	4.85 ————— 5.78	(296)
	5.04 ————— 5.62	(113)
Leber:	5.25 ————— 5.65	(4,5)
	5.1 ————— 5.6	(13)
	5.1 ————— 5.6	(77)
	5.2 ————— 5.7	(123)
(nach CdSO ₄ -Fällung:	5.4 ————— 5.7	
	5.46 ————— 5.78	(296)
	5.0 ————— 5.6	(42)
	5.2 ————— 5.6	(295)
	5.35 ————— 5.56	(113)
Fetale Leber: (24.-28. Woche)	4.9 ————— 5.65	(4)
Zirrhot. Leber:	5.2 ————— 5.7	(83)
Hepatom:	4.9 ————— 5.65	(4,5)
Milz:	5.19 ————— 5.78	(296)
Pankreas:	5.19 ————— 5.55	(113)
Pankreas-Ca (prim.):	5.19 ————— 5.54	(113)
Pankreas-Ca (sek.):	5.19 ————— 5.54	(113)
Niere:	5.25 ————— 5.78	(296)
	5.12/5.25	(113)
Nierenzell-Ca (prim.):	5.25 ————— 5.54	(113)
Nierenzell-Ca (sek.):	5.25 ————— 5.54	(113)
Duodenum:	5.25 ————— 5.56	(114)
Kolon	5.20 ————— 5.55	(113)
Kolon-Ca:	5.25 ————— 5.54	(113)
Lunge:	4.9 ————— 5.4	(178)
Lungen-Ca (Pool ver- schied. Histologie)	4.9 ————— 5.4	(178)
Herz:	4.8 ————— 5.4	(13)
	4.6 ————— 5.6	(42)
Knochenmark:	5.2 ————— 5.62	(296)
Plazenta		
- Frühschwangerschaft	4.9 ————— 5.7	(83)
- mittlere Schwangerschaft (14. - 20. Woche)	4.7 ————— 5.7	(175)
- Entbindung	4.8 ————— 5.5	(166)
Akute myeloische Leukämie (Leber, Milz, Serum)	5.25 ————— 5.65	(4,5)
Akute Monozytenleukämie (Leber):	4.8 ————— 5.6	(295)
HeLa-Zellen:	4.8 — 4.9	(13)
	4.8 — 5.0	(123)

Zwischen bestimmten Gruppen von Ferritinen ist eine Unterscheidung anhand ihrer Immunreaktivität möglich, so z.B. zwischen Ferritin aus normaler Milz und Hodgkin-Milz (näheres siehe 2.1.4).

Untersuchungen mit der Isoelektrofokussierung (IEF) zufolge liegt der isoelektrische Punkt (IEP) des eisenbeladenen Ferritins bei saureren Werten als der des Apoferritins (129, 174); nach HOY und JACOBS (129) erfolgt mit der Eisenbeladung sogar eine Verschiebung der Immunreaktivität des Proteins.

2.1.4 Isoferritine und ihre immunologische Heterogenität

Wie bereits oben erwähnt, findet sich in menschlichen (siehe Tabelle 1) und tierischen (77) Organen nicht ein homogenes Ferritin, sondern jeweils eine gewebsspezifisch zusammengesetzte Gruppe von Isoferritinen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (pI) von 4.6 (42), 4.7 (175), bzw. 4.8 (13, 83, 295) bis 5.7 (83, 175), bzw. 5.8.8 (296). In Anlehnung an die in Tabelle 1 aufgeführten Ergebnisse (4, 5, 13, 42, 77, 83, 113, 123, 175, 178, 295, 296) soll an dieser Stelle folgende Einteilung der Isoferritine anhand ihres pI erfolgen:

$pI \leq 5.0$	sauer
$5.0 < pI \leq 5.2$	schwach sauer
$5.2 \leq pI \leq 5.4$	schwach alkalisch
$5.4 < pI$	alkalisch

In normaler humaner Leber werden aufgrund von Untersuchungen mittels der IEF fünf (296) bzw. sechs (4, 13, 189) Isoferritine vermutet. Nach AKAHONAI et al. (4, 5) existieren dabei vier Hauptbanden mit den pI 5.25 - 5.33 - 5.47 - 5.65, nach YOSHINO et al. (296) fünf Banden mit den pI 5.46 - 5.53 - 5.62 - 5.71 - 5.78.

Ein Einfluß der Präparationsmethode auf das Verhalten der Isoferritine in der IEF ist nicht auszuschließen - so berichten HAZARD et al. (123) über eine Einengung des pI-Bereichs bei Cadmiumsulfat-kristallisiertem Leberferritin (siehe 2.1.3) auf pI 5.4 - 5.7 gegenüber pI 5.2 - 5.7 bei nicht Cadmium-behandeltem Ferritin.

AKAHONAI et al. (4) fanden sowohl im Ferritin fetaler Leber (24. - 28. Woche) als auch des Hepatoms neben den in der Leber vorkommenden Banden (s.o.) zwei zusätzliche schwache Banden mit pI 4.9 und 5.1; beim Hepatom erschienen jedoch die Isoferritine im Bereich 5.1 - 5.33 stärker erhöht.

Bei der Analyse von Ferritin aus Leber, Milz und Serum bei akuter myeloischer Leukämie ergab sich beim gleichen Untersucher jedoch kein Anhalt für die Existenz saurer Isoferritine; in einem pI-Bereich des Gesamtferritins von 5.25 - 5.65 wurde eine Erhöhung der alkalischen Isoferritine von pI 5.47 - 5.65 festgestellt.

Nach YODA und ABE (295) besaß Ferritin aus der Leber eines Patienten mit akuter Monozytenleukämie saure Anteile in einem pI-Bereich von 4.8 - 5.6. Untersuchungen von primärem und sekundärem Pankreas-Ca (113), primärem und sekundärem Nierenzell-Ca (113), Kolon-Ca (113) und Lungen-Ca verschiedener Histologie (178) ergaben jedoch im Vergleich zum gesunden Organ keine Verschiebung des Isoferritinprofils.

Während sich in Leber und Milz (296) vorwiegend alkalische Ferritine finden, gelten als Quellen saurer Ferritine neben o.g. Geweben vor allem Herz und HeLa-Zellkulturen (Zelllinie von Cervix-Ca); im Herzen findet sich nach AROSIO et al. (13) ein Spektrum von pI 4.8 - 5.4, nach BREDEKAMP und JOUBERT (52) von pI 4.6 - 5.6. Ausschließlich saure Ferritine im Bereich von pI 4.8 - 4.9 nach AROSIO et al. (13), bzw. pI 4.8 - 5.0 nach HAZARD et al. (123) wurden in HeLa-Zellen gefunden. Saure Anteile von Ferritin offenbart auch die Plazenta mit

pI 4.9 - 5.7 in der Frühschwangerschaft nach DRYSDALE und SINGER (83), mit pI 4.7 - 5.7 in der mittleren Schwangerschaft (14. - 20. Woche) nach LAVOIE et al. (175) und mit pI 4.8 - 5.5 bei Geburt nach KONIJN et al. (166), weiterhin Lunge und Lungenkarzinom mit pI 4.9 - 5.4 nach LINDER et al. (178).

Serumferritine finden sich nach YOSHINO et al. (296) in einem weiten Bereich von pI 4.85 - 5.78 (sechs Banden: 4.85 - 5.12 - 5.39 - 5.53 - 5.64 - 5.78), bzw. nach HALLIDAY et al. (113) pI 5.04 - 5.62.

Beobachtungen sprechen dafür, daß sich verschiedene Ferritine nicht allein in ihrem pI, sondern auch in ihrer Immunreaktivität unterscheiden: Ferritin aus der Milz eines Patienten mit M. Hodgkin erwies sich im Leukozyten-Migrations-Inhibitions-Test immunologisch different zu Ferritin aus normaler Milz (116). Bei der Immunperoxidase-Färbung von Schnitten der menschlichen Milz konnten mittels eines Antiserums gegen Milz-Ferritin sowohl polymorphkernige Zellen als auch sinusoidale Milzgrenz-zellen, mittels Antiserum gegen Herz-Ferritin jedoch nur polymorphkernige Zellen angefärbt werden (167).

Ein von JONES und WORWOOD (146) hergestellter, auf Milz-Ferritin basierender IRMA ergab wesentlich höhere Werte bei der Messung von alkalischem Ferritin, entsprechend wurden in einem auf Herz-Ferritin basierenden IRMA höhere Werte bei saurem Ferritin gemessen. Bei Messungen in Erythrozyten-Hämolysat mit beiden IRMA-Systemen wurden von JACOBS et al. (141) eine quantitative Kreuzreaktion von fünf Prozent ermittelt.

HAZARD et al. (123) gelang es, ein vom Meerschweinchen produziertes Antiserum gegen HeLa-Ferritin durch Absorption mit Leber-Apoferritin soweit zu reinigen, bis es im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest zwar noch mit dem vorwiegend sauren Herz-ferritin und mit HeLa-Ferritin (121), aber nicht mehr mit dem alkalischen Leberferritin reagierte.

Anschließende Serumbestimmungen im RIA ergaben im Vergleich zu einem auf Leber-Ferritin basierenden Assay besonders bei bestimmten malignen Erkrankungen (Teratoblastom, Pankreas-Ca, Gallenblasen-Ca, Magen-Ca, Lungen-Ca) exzessiv erhöhte Werte (122).

ALPERT et al. (8) konnten in der Gegenstromelektrophorese und im ELISA zeigen, daß ein auf dieselbe Art hergestelltes und absorbiertes Antiserum gegen HeLa-Ferritin, nicht jedoch ein Antiserum gegen Leber-Ferritin mit Ferritin aus der Zelllinie eines hepatozellulären Karzinoms reagierte.

JONES et al. (147) zufolge reagiert ein ebenfalls vom Meer-schweinchen produziertes, jedoch mit Milz-Ferritin absorbier-tes Antiserum gegen HeLa-Ferritin sowohl im Agar-Gel-Diffusions-test, als auch im RIA besser mit HeLa- und Herz- als mit Milz-Ferritin. Mit Antiseren gegen Plazenta-, Leber- sowie Ferritin aus Leukozyten bei Monozytenleukämie konnten ASAKAWA et al. (15) in Seren von Patienten mit malignen und nicht malignen Erkrank-ungen in der Gegenstromelektrophorese je nach verwendetem Antiserum verschieden hohe Werte messen.

Unter Zugrundelegung von Milz-, Leber-, Plazenta- und Herz-ferritin als Standard erhielten MARESCHAL et al. (192) beim Ver-gleich von acht verschiedenen kommerziellen Assays (IRMA und RIA) je nach gewähltem Standard verschiedene Standardkurven, was als Hinweis für unterschiedliche Immunreaktivität zu wer-ten ist. Die Standardkurven für Leber- und Milz-Ferritin waren nahezu identisch.

Die sauren und alkalischen Eigenschaften, verbunden mit der un-terschiedlichen Immunreaktivität werden von den meisten Auto-ren mit der heterogenen Zusammensetzung der Isoferritine aus ihren Untereinheiten H und L erklärt. Die Ursache der relati-ven Acidität von HeLa- und Herz-Ferritin wird in ihrem gegen-über Leber- und Milzferritin hohen Gehalt an sauren H-Unterein-heiten gesehen. HANN et al. (117) fanden in HeLa-Ferritin 70 - 90% H- und nur 10 - 30% L-, jedoch in Leber-Ferritin weniger als 20% H- und mehr als 80% L-Untereinheiten. Nach KONIJN et al. (166) besteht der alkalische Anteil des Plazentaferritins zu

88% aus L- und zu 12% aus H-Untereinheiten, während der sauerste Anteil nur 56% L-, jedoch 44% H-Untereinheiten enthält. Dieser Theorie stehen die Beobachtungen gegenüber, daß Antikörper gegen Leber-Ferritin mit den sauren Isoferritinen des Serums (pI 4.85 und 5.12), welche in der Leber nicht gefunden werden, reagieren (296), gleichzeitig jedoch gegen Herz-Ferritin gerichtete Antikörper die sauren Anteile des Serumferritins nicht erkennen (292). Dies spricht in Verbindung mit dem Ergebnis von MUFTI et al. (207), nach dem sich ehemals saures Serumferritin nach Abspaltung von Sialinsäure mittels Neuramidase in der IEF alkalisch verhält, dafür, daß zumindest bei den Serumferritinen die Glykosylierung für deren isoelektrische und immunologische Mikroheterogenität mitverantwortlich ist.

Die unterschiedliche Clearance von Milz- und Plasmaferritin, welches jeweils gesunden Probanden injiziert worden war, soll nach CRAGG et al. (68), ebenfalls auf immunologische Unterschiede zwischen Organ- und Plasmaferritin hindeuten. Während ZUYDERHOUDT et al. (300) bei verschiedenen, unter Verwendung präparativer Isoelektrofokussierung gewonnenen Fraktionen normalen Leberferritins sowohl in der radialen Immundiffusion als auch im ELISA keine unterschiedliche Immunreaktivität feststellen konnten, ergab die Testung saurer und alkalischer Anteile von Plazentaferitin im ELISA unter Verwendung eines Antikörpers gegen Milzferritin KONIJN et al. (166) zufolge zwei Standardkurven unterschiedlicher Steigung. Trotz laut IEF saurer Leberferritine bei akuter monozytärer Leukämie konnten YODA und ABE (295) in der Doppel-Immundiffusion und Immunelektrophorese keinen immunologischen Unterschied zu normalem Leber-Ferritin feststellen.

Über einen Einfluß des Eisengehaltes auf die immunologischen Eigenschaften wird von van OOST und WILLEKENS (219) berichtet: Nach Entfernung des Eisens aus Ferritin war bei der Testung in kommerziellen Assays bei manchen Systemen ein Anstieg der Immunreaktivität zu beobachten. PORTER (239), zufolge reagiert

präpariertes Apoferritin ca. eineinhalb mal stärker im RIA als das entsprechende Holoferritin.

Ferritin aus tierischen Organen zeigt sich sowohl isoelektrisch - Ferritin aus Pferdemiß besitzt einen pI von 4.22 - 4.60 (275) gegenüber 5.19 - 5.78 beim Menschen (296) - als auch antigene-tisch weit entfernt vom entsprechenden humanen Ferritin; so konnten GRAIL et al. (103) bei der Prüfung von Mäuseleberferri-tin in kommerziellen Humanferritin-Assays nur eine minimale Immunreaktivität feststellen.

Zur Herstellung von Antiseren gegen saure Ferritine wurde von einigen Autoren das Meerschweinchen, bzw. Schaf bevorzugt (13, 147, 191), während Kaninchen mehr Antikörper gegen alkalisches Ferritin bilden sollen. JONES und WORWOOD (146) gelang es je-doch, auch im Kaninchen ein Antiserum gegen saures Herzferri-tin herzustellen.

2.1.5 Vorkommen

Sowohl im Tier- als auch im Pflanzenreich offenbart sich das Ferritin als ein nahezu ubiquitär vorkommendes Protein. Bereits aus einfachsten Organismen, z.B. *Azobacter chroococcum*, konnte ein sog. "Bakterioferritin" isoliert werden, welches immunolo-gisch zwar mit Phytoferritin, jedoch nicht mit Ferritinen von Mensch und Pferd kreuzreagierte (64). Das Vorhandensein von Fer-ritin wurde weiterhin bei Pilzen (71), Pflanzen (133) und ver-schiedenen Tierklassen, wie der Insekten (101), Amphibien (271) und Säugetiere - so z.B. in Mäuseleber (196), Pferdemiß (173) und Schafsmiß (209) - nachgewiesen.

Die Lokalisation von Ferritin gelang mit der Immunperoxidase-färbung in Hepatozyten, Kupffer-Zellen und Histiozyten des Por-talfeldes in der menschlichen Leber (194), den Polymorphkernigen

und Sinusoidalzellen der Milz (siehe 2.1.4), den proximalen Tubuluszellen der Niere, den Parietalzellen des Magens, den periacinären Zellen der Mamma, den Histiozyten sowohl des Knochenmarks als auch des retikuloendothelialen Systems, dem Cervixepithel des Uterus, den epidermalen Zellen der Haut, nicht jedoch in der Gallenblase, der Schilddrüse und den Bronchien (194).

Weiterhin wurde Ferritin in den Organen Herz (13, 42, 240), Lunge (147, 178) Pankreas (113, 240), Duodenum (114), Kolon (113), Plazenta der Früh- und Spätschwangerschaft (14, 15, 66, 83, 175) sowie in fetaler Leber (4, 53) und Embryonenhaut (248) nachgewiesen.

Ferritin konnte ebenfalls in Neoplasien entdeckt werden. Nach JACOBSEN und JACOBSEN (145) erwiesen sich bei der Immunperoxidasefärbung von je zwölf Gewebeschnitten alle zwölf Nieren-, zehn Prostata-, sieben Mamma- und nur zwei Colon-Karzinome, jedoch bei allen o.g. Neoplasien die im umliegenden Gewebe befindlichen Histiozyten als Ferritin-positiv.

Analog dazu konnten ROSIELLO et al. (252) mit der gleichen Methode nur in der Hälfte von 40 Fällen mit Mamma-Ca die Tumorzellen schwach anfärben, während das die neoplastischen Zellen umgebende Bindegewebe und Histiozyten ein stärkeres Färbeverhalten aufwiesen.

Der Nachweis von Ferritin gelang außerdem in Lebermetastasen von Mamma-Ca (190) Lungen-Ca verschied. Histologie (168, 169, 171, 178), Ovarial-Ca (168, 169), Hepatom (4, 5), primärem und sekundärem Pankreas-Ca (113), primärem und sekundärem Nierenzell-Ca (113), Kolon-Ca (113), Hodentumoren verschiedener Histologie (145) sowie in verschiedenen Zellkulturen von Cervix-Ca (13, 123), hepatocellulärem Karzinom (8) und anderen malignen Tumoren (248).

Über das Vorkommen von Ferritin in Erythrozyten liegen Ergebnisse quantitativer Bestimmungen vor; diese streuen jedoch in einem

weiten Bereich (siehe Tabelle 2). Interessant erscheint allerdings das in Übereinstimmung verschiedener Untersucher (58, 62, 141, 231) gefundene Überwiegen des Ferritins vom Herz-Typ zu sein. Von ALI et al. (6) wird für Erythroblasten ein gegenüber reifen Erythrozyten etwa 200 bis 2000fach höherer Ferritingehalt angegeben. DERTEL et al. zufolge enthält Knochenmark $0,31 \pm 0,13 \mu\text{g}$ Ferritin pro mg Naßgewicht (215), wovon sich beim Gesunden etwa 90% im Retikulum und nur 10% in den hämopoetischen Zellen befinden (218).

Bezüglich des Ferritingehalts weißer Blutkörperchen, wie Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten siehe Tabelle 2.

Erythrozyten	Granulozyten	Monozyten	Lymphozyten	N	Assay	Autor, (Ref.)
13 ± 10 (4 - 47)	4600 ± 2200 (1700 - 7900)	4200 ± 1800 (1600 - 6800)	Ery 32 Grz 5 Mono 5		Gamma-Dab	Van der WEYDEN (276)
12,4 ± 1,0 (5,1 - 34,0)				37	Milz-Typ ----- Herz-Typ	PEIERS (231)
123,1 ± 6,6 (64,8 - 357,1)						
24 ± 17 118 ± 83				10	Milz-Typ ----- Herz-Typ	JACOBS (141)
9,2 23,6				20	Leber-Typ ----- Herz-Typ	CAZZOLA et al. (58)
8,9 22,7				68	Leber-Typ ----- Herz-Typ	CAZZOLA et al. (62)
	7000 ± 4600 3200 ± 2400	15600 ± 7000 38400 ± 21600	6600 ± 5700 8600 ± 6600	7	Milz-Typ ----- Herz-Typ	JONES et al. (148)

Tabelle 2: Ferritingehalt in peripheren Blutzellen. Bestimmung mit einem kommerziellen Assay (276), bzw. mit auf Milz-(141, 148, 231), Leber-(58, 62) und Herz-ferritin (58, 62, 141, 148, 231) basierenden Assays.
Einheit: 10 -18g/Blutzelle

PAPENHAUSEN et al. (227) entdeckten mittels Immunfluoreszenz Ferritin auf der Oberfläche eines Anteils peripherer Blutlymphozyten; dieser war bei Patienten mit M. Hodgkin und Mamma-Ca deutlich erhöht. Von MOROZ et al. (205) wurde diese Ferritintragende Lymphozytenpopulation als T-Lymphozyten erkannt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sich Ferritin - sieht man von wenigen, mit relativ unempfindlichen Methoden erzielten, negativen Ergebnissen (s.o.) ab - in praktisch allen bisher untersuchten menschlichen Geweben befindet.

In geringsten Mengen (Nanogrammbereich pro Milliliter) kommt Ferritin als normaler Bestandteil von Körperflüssigkeiten, wie Urin (23, 135, 180), Liquor (112, 265, 277) und Serum (siehe 2.1.11.1) vor.

2.1.6 Biosynthese und Abbau

Untersuchungen an Rattenleber zufolge vollzieht sich die Synthese von Ferritin sowohl an freien als auch membrangebundenen Ribosomen (164, 243, 245). Nach Zufuhr von ionisiertem Eisen wurde eine Steigerung der Apoferritinsynthese in verschiedenen Organen, wie Leber von Meerschweinchen (90, 91) und Ratte (81), Dünndarm(mukosa) des Meerschweinchens (104), in Zellkulturen vom Hepatom der Ratte (100), HeLa-Zellkulturen (65) und in zellfreien Systemen (82) beobachtet.

Aufgrund des Unvermögens von Actinomycin D - einem Inhibitor der DNA-abhängigen RNA-Synthese - die durch Eisenzufuhr bedingte Stimulation der Ferritin-Synthese zu hemmen, wird hierfür ein intrazellulärer Regulationsmechanismus auf posttranskriptioneller Ebene angenommen (65, 81, 200). Der Theorie von ZÄHRINGER et al. (298) zufolge können die noch einzelnen Ferritin-Untereinheiten durch ihr Anhaften an der reaktiven Stelle der Ferritin-mRNA deren Translation hemmen. Erst mit dem Eintritt von

Eisen in die Zelle lösen sich die Untereinheiten ab, um zum Apoferritin zu aggregieren, wodurch die bisher blockierte Ferritin-mRNA wieder für die Translation frei wird.

In der Frage nach der Differenzierung in H- und L-Untereinheiten nahmen WATANABE und DRYSDALE (285) aufgrund von Untersuchungen im zellfreien System, wobei an mRNA aus HeLa-Zellen vorwiegend H-, an mRNA aus Rattenleber jedoch hauptsächlich L-Untereinheiten gebildet wurden, an, daß die zwei verschiedenen Arten von Untereinheiten nicht etwa durch mögliche post-translationale Modifikation entstehen, sondern von unterschiedlichen Species der mRNA gebildet werden.

CASKEY et al. (56) konnten anhand von Beobachtungen an mit menschlichen Lymphozyten und Fibroblasten hybridisierten Ovarialsomazellen des Hamsters eine Zuordnung der für die Ferritinsynthese gespeicherten Erbinformation zum menschlichen Chromosom 19 nachweisen. Nach Untersuchungen von BROWN et al. (44) an Rattenleber zufolge existiert jedoch allein für die Erbinformation der L-Untereinheit eine M u l t i g e n -Familie.

Weitgehend ungeklärt erscheint die Entstehung von glykosyliertem Serumferritin (2.1.4). DRYSDALE (78) nimmt an, daß ein grosser Teil des Serumferritins zumindest bei Normalpersonen und Patienten mit Eisenüberladung glykosyliert und anschließend aktiv ins Serum sezerniert wird.

RUSSEL et al. (254) erklären jedoch auch die unterschiedlichen pIs von Organferritinen mit einer geringfügigen post-translationalen chemischen oder strukturellen Modifikation.

Die Halbwertszeit von Leberferritin bei Ratten wurde von DRYSDALE und MUNRO (81) zuerst zu 72 h, in späteren Untersuchungen von LINDER et al. (176) zu etwa 50 h bestimmt. Der Abbau von Ferritin erfolgt nach TRUMP et al. (274) durch proteolytische Verdauung innerhalb der Zelle. Manche Autoren (119, 208) halten das wasserunlösliche und in Parenchymzellen

abgelagerte Hämosiderin für ein nach teilweiser Verdauung der Proteinhülle mit Freisetzung der Mizelle gebildetes Abbauprodukt des Ferritins. Hierfür spricht u.a. die elektronenmikroskopisch beobachtete Ähnlichkeit zwischen Hämosiderin und der Eisenmizelle von Ferritin aus Pferdemilz (92).

2.1.7 Physiologische Bedeutung

Schätzungsweise 20 % der gesamten Körpereisenbestände (Mann ca. 1000 mg, Frau ca. 400 mg) sind in Form von Ferritin und Hämosiderin gespeichert (208). Ferritin besitzt eine zentrale Funktion im Eisenhaushalt des Organismus. Ferritin, dessen Biosynthese durch eine Erhöhung des Angebots an Eisen rasch gesteigert werden kann (siehe 2.1.6), bildet eine Eisenreserve, welche bei blutungsbedingten Eisenverlusten, bzw. mangelndem Angebot sowie als Eisenquelle für den Feten während der Gravidität kurz- bis mittelfristig mobilisiert werden kann (119). BLIGHT und MORGAN (33) beobachteten, daß Retikulozyten von Meerschweinchen Eisen nicht nur auf dem Umweg über das Eisen-transportprotein Transferrin, sondern auch direkt aus dem Ferritin aufnehmen und zur Hämsynthese verwenden können.

Ferritin bietet Schutz vor dem toxischen Effekt freien ionisierten Eisens, welches bereits in geringen Konzentrationen zur Denaturierung des Zellproteins führt (208). PRICE und JOSHI (241, 242) sehen in der Eigenschaft des Ferritins, außer Eisenionen auch große Mengen anderer Metallionen, wie Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , aufzunehmen, einen vorläufigen Schutz der Enzyme, bis die Biosynthese von Metallothionein, welches der Elimination dieser Ionen dient, angelaufen ist.

Noch nicht befriedigend geklärt ist die Bedeutung des Ferritins bezüglich der auf Hepatozyten von Ratten (187), bzw. HeLa-Zellen (43) gefundenen Membranrezeptoren. Eine mögliche Exo- bzw. Endocytose von Ferritin wird in diesem Zusammenhang diskutiert.

Eine ganz andere Bedeutung kommt einem Teil der Ferritine nach BROXMEYER et al. (47, 48) zu: Er postuliert die von normalen Monozyten und Makrophagen gebildeten sauren Ferritine aufgrund einer beobachteten inhibitorischen Aktivität gegenüber deren Stammzellen als "Feedback"-Regulatoren der Granulozyten/Makrophagen-Bildung. Von JACOBS (139) wird eine von den sauren Isoferritinen ausgehende Regulation der Hämopoese schlechthin diskutiert.

Von manchen Autoren wird dem Ferritin eine immunsuppressive Eigenschaft zugesprochen: Laut BULLEN und JOYCE (52) wird die bakterizide Funktion der polymorphkernigen Leukozyten bei Mäusen durch die intraperitoneale Injektion von Ferritin-Antiferritin-Komplexen gestört. Nach NIITSU et al. (211) beeinträchtigen sowohl Ferritin aus menschlichem Hepatomgewebe in Konzentrationen von weniger als einem Mikrogramm pro Milliliter als auch Seren von Krebspatienten mit hohem Gehalt an Ferritin die Lymphozytenreaktion im PHA (Phytohämagglutinin)-Test; ein Zusammenhang zwischen erhöhten Serum-Ferritinkonzentrationen und verminderter zellulärer Abwehrfunktion bei malignen Erkrankungen wird für möglich gehalten. Auch MATZNER et al. (198) erachten eine Bedeutung des Serumferritins bei der Pathogenese einer abnormen Immunfunktion bei Patienten mit M. Hodgkin und anderen malignen Erkrankungen für wahrscheinlich.

2.1.8 Ätiologie veränderter Serumspiegel bzw. des Auftretens bestimmter Isoferritine im Serum

Beim Gesunden spiegelt das Serumferritin die Eisenbestände des Körpers wieder (153). Abweichungen vom Normwert nach unten finden sich regelmäßig bereits bei latentem Eisenmangel (153, 154), nach oben bei Eisenüberladung (153, 154). CAZZOLA et al. (60) erklärten die bei Transfusionssiderose erhöhten Serumferritinspiegel mit einem Austritt von Ferritin aus dem Cytosol eisenüberladenden parenchymalen Gewebes. Bei verschiedenen benignen

und malignen Erkrankungen (siehe 2.1.11.2 und 2.1.11.3) lassen sich jedoch auch unabhängig von den Körpereisenbeständen erhöhte Serumferritinwerte, bzw. das Auftreten von normalerweise nicht im Serum vorkommenden Isoferritinen feststellen.

A. Für die Erhöhung des Serumferritins werden nach einer Zusammenstellung von SARCIONE et al. (257) folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen:

- Austritt von Ferritin aus degenerierenden Leberzellen bei Erkrankungen, welche die Leber tangieren (247).
- Freisetzung ins Serum bei Gewebsnekrosen (16).
- Freisetzung aus dem retikuloendothelialen System (163) bzw.
- Freisetzung infolge Blockade des retikuloendothelialen Systems (149),
- gesteigerte Ferritinsynthese durch Tumorgewebe (258). Für diese Erklärung sprechen sowohl die Beobachtungen von GROPP et al. (109), welchem mittels Ouchterlony- und Laurell-Technik der Nachweis von Ferritin in Extrakten von Lungentumoren verschiedener Histologie, nicht jedoch in normaler Lunge gelang, als auch von WATANABE et al. (286), wonach im Serum mit menschlichen Karzinomen transplanterter Mäuse Humanferritin nachgewiesen werden konnte, welches nach Entfernung des Tumors wieder verschwand. Allerdings konnte keine Korrelation zwischen Tumorgröße und der Höhe des Serumferritins festgestellt werden.

Weitere Erklärungsmöglichkeiten für o.g. erhöhte Serumferritinspiegel ergeben sich durch:

- die mit chronischen Entzündungen, Infektionen oder malignen Erkrankungen assoziierte Einschränkung der Erythropoese und damit verbundene Erhöhung der Eisen- und Ferritinbestände (55, 299).
- die an Rattenleber beobachtete Steigerung der Ferritinsynthese bei Entzündungen (165).
- Synthese und Austritt aus peripheren Blutlymphozyten. SARCIONE et al. (257) konnten bei peripheren Blutlymphozyten von Patienten mit M. Hodgkin verschiedener Stadien eine gegenüber Lymphozyten von Gesunden 4,2fach gesteigerte

gerte Synthese und 2,4fach schnellere Freisetzung von Ferritin feststellen. Da durch Zufuhr von Eisen kein Einfluß auf die Ferritinsynthese normaler peripherer Blutlymphozyten zu beobachten war, wurden hier von Sarcione andere, die Ferritinsynthese stimulierende Mechanismen (humorale Faktoren im Blut von Patienten mit M. Hodgkin) angenommen.

B. Bezüglich der Ursachen des verstärkten, bzw. zusätzlichen Auftretens bestimmter Isoferritine im Serum von Patienten mit malignen Erkrankungen herrscht noch weitgehend Unklarheit. Nach NIITSU et al. (211) sind bei Patienten mit Hepatom und Pankreas-Ca gegenüber Normalpersonen die alkalischen Serumferritine vermehrt, während bei CML die sauren Serumferritine stärker vertreten waren, wobei nach AKAHONAI et al. (4, 5) in Seren von Patienten mit AML eine Erhöhung der alkalischen Serumferritine gefunden wurde.

BULLOCK et al. (53) entdeckten in fetaler Leber der Frühschwangerschaft ein saures, in normaler Leber nicht vorkommendes Isoferritin, welches im zweiten Trimester der Schwangerschaft verschwand, jedoch im Gewebe eines Leberzellkarzinoms wieder zu finden war. Im Zusammenhang mit der Tatsache, daß im Hepatomgewebe eine im Vergleich zu normaler Leber relativ geringe Konzentration an Ferritin zu finden war, wurde eine vermehrte Sezernierung des dort gebildeten Ferritins in den Kreislauf angenommen.

Zum Vorkommen von sauren Isoferritinen in Tumoren bzw. Tumorzellkulturen und in tumorumgebenden Geweben siehe 2.1.4 und 2.1.5.

2.1.9 Isolierung aus Gewebe bzw. Serum

Nach Auftauen der bei mindestens -20°C gelagerten Gewebe (8, 12, 175) erfolgt eine Zerkleinerung und Homogenisation in ein- bis zweifachem Volumen physiologischer Kochsalzlösung (175, 225) bzw. anderen schwachen Salzlösungen (171, 189).

Aufgrund der oben beschriebenen thermischen Widerstandsfähigkeit des Ferritins strebt man zunächst eine Anreicherung durch Hitzefällung (67 - 80°C; 10-15 min.) aus Gewebe (49, 80, 96, 166, 184, 219, 225), Serum (4, 294), Leukozyten (283, 295) und Zellkulturen (8, 147) mit darauffolgender Zentrifugation an, worauf von einigen Autoren (175, 189) aufgrund möglicher Denaturierungsvorgänge am Ferritin (96) jedoch verzichtet wird. Darauf folgt Ansäuern des Überstands mit Eisessig auf pH 4,8 (2-10 h; 4°C) und anschließend eine Zentrifugation (159, 184, 191).

Eine weitere Anreicherung des Ferritins kann durch die Eliminierung niedermolekularer Proteine mittels Ultrafiltration (Diaflo XM-300; exclusion limit 3×10^5 Daltons) (225) oder Fällung in 30%iger (66, 111, 185), 35%iger (70), 50%iger (8, 73, 79, 80, 147, 166, 295), bzw. 60%iger (184) Ammoniumsulfatlösung, wobei sich das Ferritin im Präzipitat befindet, erzielt werden. Im Gegensatz dazu konnten LAMERZ et al. (171) bei der Extraktion von Bronchialkarzinomgewebe nach Fällung in 50%iger Ammoniumsulfatlösung noch erhebliche Mengen an Ferritin im Überstand nachweisen. Nach DRYSDALE und MUNRO (80) erfolgt in 23% Ammoniumsulfat eine Fällung des eisenreichen Ferritins, in 50% Ammoniumsulfat auch eine Fällung des Apoferritins. Ferritin kristallisiert in 5%iger Cadmiumsulfatlösung (12, 66, 105, 249), jedoch wird von HAZARD et al. (123) über eine Änderung des Verhaltens in der IEF berichtet.

Eine weitgehende Reinigung bzw. Anreicherung erfolgt durch Anionenaustauschchromatographie [CM-Cellulose (80), DEAE-Sephacel (171), DEAE-Affi-Gel Blue (225), DEAE-Sephadex A 50 (77, 294), DEAE-Sepharose 6B (219)], wobei die sauren Anteile des Serumferritins eine geringere Affinität zu DEAE-Sephadex aufweisen sollen als die alkalischen (292), durch Gelfiltration [(Sephadex 6B (4, 9, 73, 219), Sephacryl S 300 (225), Sephadex G 200 (80, 184, 294) sowie kombiniert Sepharose 6B mit Sephacryl S 200 (8), bzw. Sepharose 6B mit Sephadex G 200 (147, 171, 222)] und Immunadsorptionstechnik mittels Ferritin-Antikörper-gekoppelter CnBr-

aktivierter Sepharose 4B (45, 171, 294), wobei das Antigen durch Verwendung chaotroper Ionen in Form von 2 M KSCN in PBS (171), bzw. 3 M KSCN (294) eluiert werden kann sowie AH-Sepharose (4, 5).

Das hohe Molekulargewicht von Ferritin erlaubt seine Isolierung mittels Ultrazentrifugation (95.000g; 1h (229), 100.000g; 2h (146) 100.000g; 3h (219), wobei nach JONES und WORWOOD (146) bei dreistündiger Anwendung von 100.000g nur die sauren und stark eisenhaltigen Ferritine präzipitieren sollen.

Weitere Methoden der Reindarstellung sind die präparative Polyacrylamidgel - Elektrophorese (8, 9) und die präparative Isoelektrofokussierung mit Trägerampholyten (171).

Neben einer zumindest für Pferdeferritin anwendbaren selektiven Kristallisation von alkalischem Milz-Ferritin durch Cadmiumsulfat und saurem Herz-Ferritin durch 2-Methyl-2,4-pentanediol und Polyethylenglykol (11) läßt sich eine Darstellung der Isoferritine durch die IEF (siehe 2.1.4), Anionenaustauschchromatographie (14, 190) und Chromatofokussierung (42, 94) erreichen. Eine Auftrennung der Untereinheiten erfolgt nach Spaltung des Makromoleküls (siehe 2.1.3) in der SDS-Gelelektrophorese (10, 191) und der präparativen Elektrochromatographie (221).

2.1.10 Bestimmung von Ferritin

2.1.10.1 Qualitative bzw. halbquantitative Bestimmung von Ferritin

Eisenhaltiges Ferritin läßt sich - relativ unspezifisch - mit einer Kombination von Proteinfärbung mit Coomassie und Eisenfärbung mit Preußisch Blau anfärben (77, 212).

Seine Lokalisation in Gewebeschnitten gelingt in der Immunperoxidase-Färbung (167, 194) und der indirekten Immunfluoreszenz (25, 284).

Einfache, aber relativ unempfindliche Nachweismethoden stellen die zweidimensionale Doppeldiffusion im Agar-Gel (189) sowie die radiale Immunodiffusion (MANCINI) (283) dar.

Den Nachweis von Ferritin in Körperflüssigkeiten, vor allem im Serum, ermöglichen auch die Elektroimmunodiffusion (Empfindlichkeit 500-1000 ng/ml (284), Gegenstromimmunelektrophorese [Empfindlichkeit 400 ng/ml (117); 500-1000 ng/ml (284)] und die eindimensionale LAURELL-Raketenimmunelektrophorese (107, 108), wobei allerdings durch alle drei genannten Methoden in Normalseren kein Ferritin nachgewiesen werden kann.

2.1.10.2 Quantitative Bestimmung von Ferritin

Wegen der niedrigen Konzentration des Serumferritins bei Normalpersonen und besonders bei Eisenmangelpatienten und der Wichtigkeit exakter Mengenangaben eignen sich für Einzel- sowie Verlaufsuntersuchungen vor allem folgende Immunoassays:

Beim ENZYMIMMUNOASSAY (EIA, ELISA) werden die gegen Ferritin gerichteten Antikörper mit Enzymen, wie alkalische Phosphatase (8), Peroxidase (99) oder β -Galaktosidase (99) konjugiert; er besitzt eine Empfindlichkeit von 0,2-10 ng/ml (8, 135, 268). Eine etwa gleich hohe Sensitivität [1-5 ng/ml (151, 193)] besitzen die beiden radioimmunologischen Verfahren RADIOIMMUNOASSAY (RIA) und IMMUNRADIOMETRISCHER ASSAY (IRMA).

Das Prinzip des RIA besteht darin, daß das eingesetzte markierte Antigen mit dem in den Standards in bekannter, bzw. in den Proben in unbekannter Konzentration enthaltenen Antigen um die Bindung an den zugegebenen limitierten ersten Antikörper konkurrieren (= kompetitiv bindender Assay). Die entstandenen löslichen Immunkomplexe müssen jedoch gefällt werden oder durch Zugabe eines gegen den ersten Antikörper gerichteten zweiten Antikörpers (12, 73, 121, 123, 147, 190) in unlösliche Aggregate verwandelt werden, welche sich abzentrifugieren lassen.

Die im Präzipitat zu messende Radioaktivität verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Menge des in der Probe enthaltenen Antigens.

Der IRMA bietet den Vorteil, daß hier als Tracer der technisch einfacher zu markierende, gegen das zu messende Antigen gerichtete Antikörper verwendet werden kann. Bei dem meist gebräuchlichen "Two-Site-IRMA" wird der erste gegen das Ferritin gerichtete Antikörper (= "Catcher-Antibody") an eine feste Phase ("Solid Phase"), wie z.B. die Innenseite von Polyethylen-Röhrchen (72, 146) oder die Innenseite der Vertiefungen von Polyvinyl-Mikrotiterplatten (296) bzw. an eine Polystyrol-Kugel (RIA-Gnost, Behringwerke) gebunden und erst nach Zugabe des radioaktiv markierten, ebenfalls gegen das zu messende Antigen gerichteten Antikörpers ("Detector-Antibody"), welcher an die an der festen Phase haftenden Ferritinmoleküle bindet, eine Bestimmung des gebundenen Antigens erlaubt. In diesem Fall ist die Höhe der an der festen Phase haftenden Aktivität proportional zur Konzentration des in der Probe befindlichen Antigens.

Ein Nachteil des IRMA besteht in dem sogenannten "High Dose Hook-Effect", d.h. einem mehr oder weniger ausgeprägten Abfall der Eichkurve bei höheren Ferritinkonzentrationen, ohne dessen Berücksichtigung stark erhöhte Werte im Serum fälschlicherweise als Werte im Normbereich gemessen werden könnten (106, 150). Dieser Effekt wird mit einer von der Konzentration des Antigens abhängigen Bindungskinetik zwischen Antigen und Antikörper erklärt (54), worauf hier nicht näher eingegangen werden soll. Ihm kann jedoch durch Mitführen entsprechender Verdünnungen des ferritinreichen Serums im Test begegnet werden (106, 124).

Beim Vergleich verschiedener kommerzieller Assays fiel jedoch eine Abhängigkeit der Ergebnisse von der jeweils zur Antikörperproduktion und als Standard verwendeten Art von Ferritin

auf (103, 219, 281). Diesem Umstand wurde von verschiedenen Autoren Rechnung getragen, indem sie vorwiegend gegen alkalische Ferritine gerichtete, auf Leber- (12, 58, 59, 62, 122, 123), bzw. Milzferritin (141, 146, 147, 148, 231) basierende sowie gegen saure Ferritine gerichtete, auf Herz- (58, 62, 141, 146, 148, 231), bzw. Hela-Ferritin (12, 59, 122, 123, 147) basierende Immunoassays entwickelten. Ein mit monoklonalen Antikörpern gegen Herzferritin arbeitender IRMA wurde von CAVANNA (57) entwickelt.

2.1.11 Klinische Bedeutung der Ferritinbestimmung im Serum

2.1.11.1 Normalwerte

Die Festsetzung von Serumferritin-Normalwerten ist nicht unproblematisch: Bei Serumferritinbestimmungen mittels verschiedener Kits wurde über Normwertschwankungen von Faktor zwei (120) bis drei (152) berichtet; in einem Vergleich von sieben kommerziellen Kits (zwei IRMA, ein EIA, vier RIA) wurde ein Variationskoeffizient von 57% angegeben (103).

Ein circadianer Rhythmus des Serumferritins bei Normalpersonen konnte nicht gefunden werden (28, 72, 210); unregelmäßige tägliche Schwankungen betragen bis 9% (28) bzw. 15% (72); über geringe Veränderungen von Tag zu Tag berichteten PILON et al. (237).

Bei Unterscheidung zwischen sogenannten alkalischen und sauren Ferritinen überwiegen bei Gesunden die Spiegel an alkalischem Ferritin bei weitem (12, 59, 146, 147).

Unter Erwachsenen finden sich in der Regel höhere Serumferritinwerte, bei Männern (5, 19, 74, 89, 103, 111, 115, 135, 144, 149, 151, 153, 184, 190, 193, 201, 202, 204, 214, 226, 238, 244, 268, 296). Mit zunehmendem Alter steigen auch bei Männern die Werte an [von durchschnittlich 66 ng/ml bei 18jährigen auf 196 ng/ml bei 18-47jährigen (89)]. Ein Anstieg um 21-71% konnte bei jun-

gen Männern unter schwerster körperlicher Belastung (mit Schlafentzug und Kaloriendefizit) beobachtet werden (279).

Nach der Menopause beginnt bei Frauen das sonst niedrige Serumferritin anzusteigen (138, 184, 214), um sich im höheren Alter dem der Männer anzugleichen (244). Der Menstruationszyklus sowie die Einnahme oraler Antikonzeptiva scheint ohne nennenswerten Einfluß auf das Serumferritin zu sein (269). In der Gravidität läßt sich ein starker Abfall des Serumferritins besonders im zweiten Trimenon beobachten (157, 270). Post partum findet sich ein stark erniedrigter Serumferritinspiegel (84, 157, 270), welcher sich nur langsam [ohne Eisensubstitution bis zwei Jahre (269)] wieder erholt.

Bei Neugeborenen wurden je nach Autor gegenüber der Mutter beim Zeitpunkt der Geburt 5-33fach höhere Spiegel gemessen (41, 84, 157, 158, 267); in Nabelvenen- bzw. Nabelarterienblut ermittelte Werte waren dabei praktisch identisch (157).

Nach SIIMES (262) steigt das bei Neugeborenen ermittelte Serumferritin von durchschnittlich 101 ng/ml nach einem Monat auf 356 ng/ml, fällt jedoch bald darauf stark ab und beträgt bei Kindern im Alter von sechs Monaten bis 15 Jahren im Mittel 30 ng/ml (95%-Bereich: 7-142 ng/ml) im Vergleich zu 140 ng/ml bei erwachsenen Männern und 39 ng/ml bei Frauen. Ein signifikanter Unterschied bezüglich des Geschlechts konnte bei Kindern nicht nachgewiesen werden (206).

Unter physiologischen Verhältnissen kommt Ferritin in geringen Mengen in der Zerebrospinalflüssigkeit (112, 265, 277) und im Urin (135, 180) vor.

Serumferritin - Normalwerte (ng/ml)
Erwachsene

Land	Alter	Ge- schlecht	N	Mittelwert	Bereich	Methode (1)*	Ref.
Europa		?	44		11-200	RIA (Leber)	12
Italien					11-44	RIA (Hela)	
		m	669	157,8 ⁽³⁾	(49-327) ⁶	RIA ¹⁰	193
		w	319	59,0 ⁽³⁾	(15-153) ⁶		
		?	10	132 ⁽⁴⁾	64-240	RIA ¹⁰	60
	(23-39)	13 m	18	62,9 ⁽³⁾		RIA ¹¹	213
		5 w					
		?	54	76 ⁽⁴⁾	18-251	RIA (Leber)	59
				16 ⁽⁴⁾	5-41	" (Hela)	
		m	42	136,5 ⁽³⁾		RIA ¹⁰	74
		w	36	64,5 ⁽³⁾			
		m/w	78	103,3 ⁽³⁾	13-361		
Gröbritannien-		?	10	74 ⁽³⁾	≤ 60	IRMA (Milz)	146
nien						IRMA (Herz)	
		m/w	30		5-225	RIA (Milz)	147
					≤ 2	RIA (Hela)	
		?	100	33 ⁽⁵⁾	1-260	RIA (Milz)	
						RIA (Hela)	
	(46-78) ¹ ; 64	m	12	179 ⁽³⁾	31-400	IRMA	132
	(50-80) ¹ ; 69	w	10	146 ⁽³⁾	18-390		
		w	250	56,6 ⁽³⁾		IRMA	95
		m	75	69 ⁽³⁾	6-186	IRMA	149
		w	44	34 ⁽³⁾	3-162		
		m	14	159 ⁽³⁾	16-352	IRMA (Plazenta)	103
		w	14	74 ⁽³⁾			
		"	"	53 ⁽³⁾	5-130	IRMA (Milz)	
		w	"	22 ⁽³⁾			
		m	"	64 ⁽³⁾	15-208	EIA (Leber)	
		w	"	47 ⁽³⁾			
		m	"	71 ⁽³⁾	16-160	RIA (Leber)	
		w	"	40 ⁽³⁾			
		m	"	59 ⁽³⁾	<10-154	RIA (Leber)	
		w	"	26 ⁽³⁾			
		m	"	63 ⁽³⁾	<10-135	RIA	
		w	"	28 ⁽³⁾			
		m	"	59 ⁽³⁾	< 5-105	RIA (Milz)	
		w	"	30 ⁽³⁾			
				(= Variationskoeffizient = 57%)			
Frankreich	(22-52) ¹	m	34	94 ⁽³⁾	36-200	RIA (Milz)	111
		w	47	58 ⁽³⁾	19-150		
		m	66	67 ⁽⁵⁾	14-360	IRMA	19
		w	75	48 ⁽⁵⁾	4-182		
Dänemark	(20-50) ¹	m	30	99 ⁽³⁾	19-285	IRMA	201
		w	30	35 ⁽³⁾	5-160		
		m/w	60	67 ⁽³⁾	5-285		
	(18-45) ¹	m	118	67 ⁽⁴⁾	(20-227) ⁷	IRMA ¹²	202
		w	113	23 ⁽⁴⁾	(5-104) ⁷		
Norwegen	(20-40) ¹	m	167	174 ⁽³⁾	(52-410) ⁷	IRMA	279
		?	42	131 ⁽³⁾	40-230	IRMA	278
		?	42	170 ⁽³⁾	50-300		
		m	23	109 ⁽³⁾		IRMA ¹³	144
		w	23	79 ⁽³⁾			
		m/w	46	94 ⁽³⁾			
Schweden	73 ⁴	m	31	166 ⁽⁴⁾		IRMA (CML-Milz)	244
	"	w	22	161 ⁽⁴⁾			
	(18-55) ¹	m	23	170 ⁽⁴⁾	(46-637) ⁷		
		w	24	51 ⁽⁴⁾	(10-260) ⁷		
Österreich		m	60		(32-330) ⁷	IRMA ¹³	179
		?	80	181 ⁽³⁾		IRMA ¹³	181

Land	Alter	Ge- schlecht	N	Mittelwert	Bereich	Methode (*)	Ref.
BRD		m	96 ⁽⁴⁾		(23-397) ⁽⁴⁾	IRMA (Milz)	151
		w	36 ⁽⁴⁾		(8-159) ⁽⁴⁾		
	bereinigt nach Knochenmarkseisengehalt und intestinaler Eisenabsorption:						
		m	100 ⁽⁴⁾		(34-310) ⁽⁴⁾		
		w	49 ⁽⁴⁾		(22-112) ⁽⁴⁾		
		m	71	131 ⁽³⁾		IRMA (Milz)	153
		w	90	67 ⁽³⁾			
	Dauerblut- spender	m	87	51 ⁽³⁾			
		w	26	25 ⁽³⁾			
		m	79	98 ⁽⁴⁾	(21-447) ⁽⁷⁾	IRMA ¹¹	214
	Postmeno- pause	w	39	85 ⁽⁴⁾	(26-279) ⁽⁷⁾		
	Menstrua- tionseiter	w	63	29 ⁽⁴⁾	(8-110) ⁽⁷⁾		
		?	?		(40-200) ⁽⁷⁾	IRMA	217
		?	225	102 ⁽³⁾	30-253	?	125
AMERIKA Kanada	(20-79) ¹	m	120	93 ⁽⁵⁾	(20-330) ⁽⁹⁾	RIA (Leber)	184
	(50-79) ¹	w	60	55 ⁽⁵⁾	(9-200) ⁽⁹⁾		
	(20-49) ¹	w	60	29 ⁽⁵⁾	(4-144) ⁽⁹⁾		
		?	116	120 ⁽⁵⁾		RIA (Leber)	7
		m	44	58 ⁽⁴⁾	(19-170) ⁽⁸⁾	EIA	226
		w	80	43 ⁽⁴⁾	(15-120) ⁽⁸⁾		
		m	57	93 ⁽³⁾	10-193	RIA (Mammakarzinom)	190
		w	117	34 ⁽³⁾	10-146		
		?	?	77 ⁽³⁾ ± 48		RIA (Leber) RIA (HeLa)	122
					< 100		
	18 ⁽²⁾	m		66 ⁽⁴⁾		IRMA	89
	(30-35) ¹	m		170 ⁽⁴⁾			
	(42-47) ¹	m		196 ⁽⁴⁾			
	(18-47) ¹	m	803	127 ⁽⁴⁾	66,4-244,1		
	(18-45) ¹	w	812	46 ⁽⁴⁾	19,8-107,1		
AFRIKA Nigeria	32 ⁽²⁾ (15-60)	m/w	23	105,78 ⁽³⁾		IRMA ¹⁴	35
AUSTRALIEN		m			20-200	RIA	115
		w			10-150		
ASIEN Japan		m	50	114 ⁽³⁾ ± 46,6	26-217	IRMA ¹³	5
		w	50	57 ⁽³⁾ ± 42,8	9-170		
	(16-25) ¹	m	205	70 ⁽⁴⁾ ± 68,5	(12-411) ⁽⁷⁾	IRMA (Leber)	296
	(16-59) ¹	w	421	12 ⁽⁴⁾ ± 16,5	(1-211) ⁽⁷⁾		
		m	21	73 ⁽³⁾	20-270	EIA	135
		w	19	35 ⁽³⁾	17-83		
	24 ⁽²⁾ (21-30) ¹	w	21	30,2 ⁽³⁾ ± 24,5	3,8-121	IRMA ¹³	138
	39 ⁽²⁾ (31-50) ¹	w	19	34,5 ⁽³⁾ ± 21,0	5,5-95		
	59 ⁽²⁾ (51-69) ¹	w	12	40,7 ⁽³⁾ ± 27,8	3,0-96		
	37 ⁽²⁾ (21-69) ¹	w	52	34,0 ⁽³⁾ ± 23,6	3,0-121		
		m	11	97,2 ⁽³⁾ ± 46,7		RIA ¹⁵	268
		w	12	53,5 ⁽³⁾ ± 27,1			
		m	26	91,5 ⁽³⁾	27-230	IRMA ¹³	204
		w	46	79,0 ⁽³⁾	30-220	IRMA ¹³	
	> 50	m/w	38	88,1 ⁽³⁾ ± 30,6			
	< 50	m/w	34	78,8 ⁽³⁾ ± 26,6			
Thailand	(18-60) ¹	m	15	96 ⁽⁵⁾	37-160	IRMA	238
		w	12	52 ⁽⁵⁾	16-132		
		m/w	27	68 ⁽⁵⁾	16-160		

Tabelle 3 (2)

Kinder

Land	Alter	Ge- schlecht	N	Mittelwert	Bereich	Methode (*)	Ref.
EUROPA	(3 Mo. - 23.) ¹	m/w	22	39,7 ⁽³⁾ 36,0 ⁽⁵⁾	(18-68) ⁶	RIA ¹⁰	193
Italien	(2-4) ¹ (4-6) ¹ (6-8) ¹ (8-10) ¹ (10-12) ¹			42,9 ⁽³⁾ 38,5 ⁽⁵⁾ 46,9 ⁽³⁾ 42,5 ⁽⁵⁾ 44,2 ⁽³⁾ 42,5 ⁽⁵⁾ 47,0 ⁽³⁾ 41,0 ⁽⁵⁾ 62,5 ⁽³⁾ 63,0 ⁽⁵⁾	(24-84) ⁶ (28-76) ⁶ (19-65) ⁶ (23-12) ⁶ (35-94) ⁶		
Groß- britannien	7,7 ⁽²⁾ (1-15) ¹	m/w	63	34 ⁽³⁾ 30 ⁽⁵⁾	8-101	IRMA	131
Norwegen	(10-14) ¹	m/w	57	13,7 ⁽³⁾		RIA ¹¹	162
Finnland	(6 Mo. - 2 J.) ¹		486	31 ⁽⁴⁾	(7-142) ⁷	RIA	264
BRD	4,0 ⁽²⁾ (2-6) ¹ 10,2 ⁽²⁾ (6-14) ¹ 15,9 ⁽²⁾		10 45 10	50,4 ⁽⁴⁾ 68,4 ⁽⁴⁾ 84,2 ⁽⁴⁾	23,1-102 30,5-190 39,1-292	IRMA ¹³	206

Schwangere, Entbundene und Neugeborene

EUROPA	w in gebärfähigem Alter	154	21,3 ⁽³⁾	4,7-169,0	RIA ¹⁶	269
Groß- britannien	0-para	27	37,0 ⁽³⁾	4,7-169,0		
	1-para: im 1. J.p.p.	23	16,2 ⁽³⁾	5,8- 39,6		
	in den er- sten 2 J.p.p.	16	25,6 ⁽³⁾	10,6- 69,6		
	Grav. 12. Mo.	24	23,2 ⁽⁵⁾	7,0-103,0	RIA ¹⁶	270
	20. Mo.		12,5 ⁽⁵⁾	4,4- 63,1		
	28. Mo.		5,6 ⁽⁵⁾	2,5- 29,1		
	36. Mo.		6,0 ⁽⁵⁾	2,5- 12,5		
	40. Mo.		6,2 ⁽⁵⁾	3,4- 20,0		
	p.p. 6. Tag		12,5 ⁽⁵⁾	4,8- 48,1		
	6. Mo.		15,0 ⁽⁵⁾	5,6- 51,2		
	24. Mo.		15,3 ⁽⁵⁾	2,6- 36,3		
	Mutter p.p.	115	30,3 ⁽³⁾	6,4-144,0	?	158
	Neugeb. m.	59	216,1 ⁽³⁾	± 120,2		
	w.	56	187,1 ⁽³⁾	± 90,5		
	m/w	115	169 ⁽³⁾	55,0-296,0		
Niederlande	Mütter bei Geb.	15	5 ⁽³⁾	± 6	RIA	84
	Mütter 12 Mo p.p.	15	18 ⁽³⁾	± 9		
	Neugeborene	15	168 ⁽³⁾	± 44		
Jugoslawien	Mutter p.p.		15,4 ⁽³⁾	± 13,6	RIA	267
	Neugeb. m	30	122,9 ⁽³⁾	± 71,1		
	w	35	161,6 ⁽³⁾	± 78,6		
	m/w	65	143,8 ⁽³⁾	± 83,0		
Norwegen	Mütter bei Geburt	54	29,1 ⁽³⁾	± 18,6	RIA ¹¹	41
	Neugeb.	54	144,6 ⁽³⁾	± 73,2	46,0-400,0	
AMERIKA USA	Grav.: 28.-34. Mo.	22	18,4 ⁽³⁾	± 9,1	RIA ¹⁶	85
	Ende der Grav.	14	19,4 ⁽³⁾	± 8,3	7 - 26	
ASIEN Japan	w (20-30) ¹	10	63,0 ⁽³⁾	± 34,7	IRMA ¹³	157
	Grav.: 1. Trimenon	17	97,4 ⁽³⁾	± 39,4		
	2. " "	26	22,2 ⁽³⁾	± 14,6		
	3. " "	17	14,7 ⁽³⁾	± 7,7		
	Mütter bei Geburt	33	27,6 ⁽³⁾	± 15,6		
	5. Tag p.p.	27	36,0 ⁽³⁾	± 20,3		
	Neugeb.		287,7 ⁽³⁾	± 180,4		

Tabelle 3 (3)

Urinferritin Normalwerte (ng/ml)

Land	Alter	Ge- schlecht	N	Mittelwert	Bereich	Methode (Antikörper)	Ref.
U.S.A.	?	?	?	2,2 ⁽⁴⁾		IRMA	180
Japan		m	21	4,1 ⁽⁴⁾	1,3 - 16,0	EIA	135
		w	19	1,8 ⁽⁴⁾	0,7 - 6,2		

Liquorferritin Normalwerte (ng/ml)

Belgien			22	2,3 ⁽⁵⁾	0,9 - 4,4	Particle Counting Immunoassay ⁽⁷⁾	265
Schweden	35,3 ⁽²⁾ (17-58) ⁽¹⁾	m/w	15	5,1 ⁽³⁾	0,2 - 8,3 ⁽³⁾	RIA	112
Spanien			10	5,78 ⁽³⁾	±0,60	RIA 12	277

- (1) = Altersbereich
(2) = Durchschnittsalter
(3) = arithmetischer Mittelwert
(4) = geometrischer Mittelwert
(5) = Median
(6) = 90% - Vertrauensbereich
(7) = 95% - "
(8) = 97,5% "
(9) = 2.-98. Perzentile

Kommerzielle Kits:

- (10) = Liso-phase RIA System Ferritin kit, Lepetit, Milano, Italy
(11) = Fer - Iron kit, Ramco Lab., U.S.A.
(12) = Phadebas Ferritin, PRIST, Pharmacia, Sweden
(13) = RIA-Gnost Ferritin, Behringwerke AG, Marburg
(14) = IRMA-Nordiclab, Oulu, Finnland
(15) = ApacTM ferritin kit, Daiichi Radioisotope Lab., Tokyo, Japan
(16) = Gamma Deb kit, Travenol Lab., Cambridge, Massachusetts
(17) = Particle Counting Immunoassay, Technicon PACIA, Genf

(*) = Ferritinquelle bzgl. Herstellung v. Tracer, Antikörper und Standard

Tabelle 3 (4)

VERÄNDERUNGEN DES MENSCHLICHEN SERUMFERRITIN-SPIEGELS

NORMALWERTE: MÄNNER: verschieden je nach angewandtem Verfahren,
FRAUEN: siehe Tabelle 3

MAXIMALES NORMWERT-LIMIT: bei Anwendung unseres eigenen Assays
150 ng/ml

ABFALL EISENMANGEL (latent, manifest=Anämie)
ZÖLIAKIE (nicht behandelt)

ANSTIEG NICHTMALIGNE ERKRANKUNGEN

EISENÜBERLADUNG: HÄMOCHROMATOSE
HÄMOSIDEROSE

APLASTISCHE ANÄMIE

PERNIZIÖSE ANÄMIE

SICHELZELLANÄMIE

THALASSÄMIE

LEBERERKRANKUNGEN: HEPATITIS
ZIRRHOSE

INFOLGE CHRONISCHEM ALKOHOLISMUS

HERZINFARKT

(PANKREATITIS, ANDERE AKUTE UND CHRONISCHE ENTZÜNDUNGEN,
VIRALE UND BAKTERIELLE INFESTIONEN, HYPERTHYREOSE)

MALIGNE ERKRANKUNGEN

HEPATOM (bei 76-100%)

PANKREAS-CA (bei 75%)

METASTASIERENDES MAGEN-CA (bei 80%)

LUNGEN-CA (bei 61-77%)

MAMMA-CA (bei 25-49%)

HODENTUMORE UND (bei 63-67%)
OVARIALKARZINOME

AKUTE UND CHRONISCHE LEUKÄMIEN (bis 100%)

M. HODGKIN (bei 69-94%)

Tabelle 4

2.1.11.2 Nichtmaligne Erkrankungen Eisenmangel

Das bisher wichtigste Einsatzgebiet der Serumferritinbestimmung ist die Diagnostik von Eisenmangelzuständen. Nach neueren Untersuchungen leiden in Japan (296) 41% der Frauen (3,3% der Männer) an einem latenten Eisenmangel sowie 6,5% (1,4%) an einer Eisenmangelanämie, während in Mitteleuropa (151) über 10% der geschlechtsreifen Frauen und 2% der gleichaltrigen Männer einen manifesten Eisenmangel aufweisen.

Aufgrund der ausgezeichneten Korrelation des Serumferritinspiegels mit dem Gehalt an Knochenmarkseisen (24, 93, 144, 203, 215) lassen sich mit dieser nichtinvasiven Methode quantitative Informationen über die Größe der vorhandenen Eisenspeicher im Körper gewinnen. Eine hypochrome Anämie, verbunden mit einem Serumferritinspiegel unter 12 ng/ml (120, 150, 151), unter 15 ng/ml (97), bzw. unter 18 ng/ml (272) ist als Eisenmangelanämie zu diagnostizieren. Große Bedeutung kommt der Serumferritinbestimmung jedoch bei der Aufdeckung von latenten und prälatenten Eisenmangelzuständen, d.h. einer klinisch noch nicht manifesten Erschöpfung der Eisenspeicher, zu (150, 230). Zahlreiche Autoren erachten deshalb den Einsatz der Serumferritinbestimmung zur Überwachung des Eisenhaushalts bei Blutspendern (26, 89, 126, 153), Trägerinnen der Intrauterinspirale (110, 236), Hämodialysepatienten (22, 74, 86, 128) und anderen Patienten (17, 161) sowie zur Kontrolle einer Eisensubstitutionstherapie (21, 34, 155, 156, 188, 290), als geeignet und sehen in dieser Methode einen weitgehenden Ersatz für die Eisenfärbung im Knochenmarkspunktat (143, 154, 201, 216).

Das Serumferritin stellt sowohl in der Unterscheidung zwischen Eisenmangelhypoferrämie und reaktiver Hypoferrämie als Folge chronisch entzündlicher oder konsumierender Erkrankungen (291), als auch in der Differentialdiagnose der mikrozytären hypochromen Anämien - Abgrenzung der Eisenmangelanämie von anderen, wie Tumor-, Infekt-, sideroachrestischer Anämie und Thalassämie - einen wichtigen Parameter dar (151).

	Eisen- mangel- Anämie	Tumor- und Infekt- Anämie	sidero- achresti- sche Anämie	Thalass- aemia minor
Hämoglobin	erniedrigt	erniedrigt	erniedrigt	erniedrigt
Serumeisen	erniedrigt	erniedrigt	erhöht	normal bis erhöht
totale Eisenbin- dungskapazität	erhöht	normal bis erniedrigt	normal bis erniedrigt	normal bis erniedrigt
Serumferritin	erniedrigt	normal bis erhöht	erhöht	erhöht

Abb. 2: Diagnostische Bedeutung der Serumferritin-Bestimmung in der Differentialdiagnose hypochromer Anämien.
Nach KALTWASSER, J.P.; Indikation zur Serumferritin-Bestimmung. DMW 105:319 (1980). S. 320

Eine Einschränkung des Aussagewertes bezüglich der Eisenspeicher erfährt das Serumferritin bei entzündlichen Erkrankungen (7, 160) sowie Leber- und malignen Erkrankungen (7). In diesen Fällen zeigt zwar ein niedriger Serumferritinspiegel einen Eisenmangel an, jedoch schließt ein normaler Spiegel einen Eisenmangel nicht aus.

Eisenüberladung

Exzessiv hohe Serumferritinspiegel sind bei Eisenüberladung (Hämochromatose und Hämosiderose) zu finden (18, 20, 63, 114, 115, 153). Bei Unterscheidung zwischen alkalischen und sauren Ferritinen wurde bei Hämochromatose im Serum eine erhebliche Zunahme des Ferritins vom Milz-Typ gegenüber einem nahezu gleichbleibenden Spiegel des Ferritins vom Herz- (146) bzw. Hela-Typ (147) gemessen. CAZZOLA et al. (58) konnten in Erythrozyten von Patienten mit Eisenüberladung eine bedeutende Vermehrung der Ferritine, sowohl vom Leber-Typ (186,5 Atto-gramm = 10^{-18} Gramm/Zelle), als auch vom Herz-Typ (260,5 ag/Zelle) gegenüber Erythrozyten von Normalpersonen (Leber-Typ 9,2; Herz-Typ 23,6 ag/Zelle) feststellen.

Auch bei Eisenüberladung besteht nach OERTEL et al. (215) eine Korrelation zwischen Serumferritin und Knochenmarkeisen; jedoch läßt sich aufgrund der Serumferritinwerte keine - wie bei Biopsiematerial möglich - überschneidungsfreie Stadieneinteilung der Eisenüberladung vornehmen (76). Da das Serumferritin relativ früh im Verlauf der Eisenüberladung ansteigt (19), wird es von einigen Autoren zur Frühdiagnostik der idiopathischen Hämochromatose (IHC) empfohlen (115, 150). In einem Screening-Test von 243 Angehörigen IHC-belasteter Familien waren die Serumferritinspiegel bei 98% (z.Vgl. Serumeisen bei 76%) aller Verwandten mit vermehrter Eisenspeicherung, jedoch nur bei 1,8% (Serumeisen bei 10%) derer mit normalen Eisenbeständen erhöht, wobei es sich in den Fällen falsch positiver Aussagen ausschließlich um Alkoholiker handelte (115). Zur Therapiekontrolle wird die Serumferritinbestimmung als nützlich erachtet (18, 98).

Eisenmangel

1. Diagnose der Eisenmangelanämie
2. Diagnose des latenten Eisenmangels
3. differentialdiagnostische Abgrenzung von Anämien ohne Eisenmangel
4. Überwachung von Risikogruppen zur Aufdeckung von Eisenmangel (zum Beispiel Blutspender, Schwangere, Kleinkinder)
5. Überwachung einer oralen Eisentherapie und Bestimmung des Zeitpunktes für das Absetzen der Therapie
6. Überwachung des Eisenstatus bei Hämodialyse-Patienten

Eisenüberladung

1. Diagnose der idiopathischen Hämochromatose und Screening von Familienmitgliedern zur Erfassung des präklinischen Stadiums der Erkrankung
2. Überwachung der Eisenmobilisationstherapie bei Eisenüberladung

Abb. 3: Indikation zur Serumferritin-Bestimmung bei Erkrankungen, welche den Eisenhaushalt betreffen.
Aus KALTWASSER, J.P.; Indikation zur Serumferritin-Bestimmung. DMW 105:319 (1980). S. 320.

Serumferritin bei Eisenmangel (ng/ml)

	N	Mittelwert	Bereich	Methode	Ref.
prälatent	48	39 ⁽¹⁾	19-79	IRMA	150
latent	13	21 ⁽¹⁾	9-51		
manifest (Anämie)	63	5 ⁽¹⁾	2-12		
	11	8,7 ⁽¹⁾ ±4,1	1-16	RIA	114
	90		< 15	RIA	97
	10	5,3 ⁽²⁾	1,0-13,5	IRMA ⁽⁴⁾	206
manifest (Anämie)	13	3,4 ⁽³⁾	1,5-9	IRMA	262
latent	6	10,6 ⁽³⁾	4,5-41		

Tab. 5: 1= arithmetischer Mittelwert

2= geometrischer Mittelwert

3= Median

4= RIA-Gnost Ferritin, Behringwerke AG, Marburg

Serumferritin bei Eisenüberladung (ng/ml)

	N	Mittelwert	Bereich	Methode (*)	Ref.
Hämochromatose ⁽²⁾	10	1690 ⁽³⁾ ± 1000 23 ± 15		IRMA (Milz) IRMA (Herz)	146
Hämochromatose	2		1497-8030 < 2	RIA (Milz) RIA (HeLa)	147
Hämochromatose ⁽¹⁾	8	1870 ⁽³⁾	540-4200	IRMA	63
Hämochromatose ⁽¹⁾	8	1170 ⁽³⁾	660-4000	RIA	114
Hämochromatose ⁽²⁾	3	663 ⁽³⁾	120- 940		
Hämochromatose ⁽¹⁾	16	2365 ⁽³⁾	248-7600	IRMA	18
Hämochromatose ⁽¹⁾	14	960 ⁽⁵⁾	155-6020	IRMA (Milz)	20
Hämochromatose ⁽²⁾	7	34 ⁽⁵⁾	4- 112		
Hämochromatose	41		670-4100	RIA	115
Hämochromatose	6	1916 ⁽³⁾ 2860 ⁽³⁾	675-5120 815-6685	IRMA IRMA	278
Hämochromatose	2		5000; 950 190; <100	RIA (Leber) RIA (HeLa)	122
erworbene trans- fusionelle Ei- senüberladung	13	1573 ⁽⁴⁾	496-4320	RIA ⁽⁶⁾	60
erworbene trans- fusionelle Ei- senüberladung	4	3520 ⁽⁴⁾ ± 3180 36 ± 15		IRMA (Milz) IRMA (Herz)	146

Tab. 6: 1= unbehandelt

2= behandelt

3= arithmetisches Mittel

4= geometrisches Mittel

5= Median

6= Liso-phase RIA System Ferritin kit, Lepetit, Milano, Italy

(*)= Ferritinquelle bzgl. Herstellung von Tracer, Antikörper und Standard.

Andere nichtmaligne Erkrankungen

Exzessiv erhöhte Ferritinkonzentrationen im Serum wurden ausser bei Eisenüberladung in Fällen hämatologischer Erkrankungen, wie aplastischer Anämie mit Werten zwischen 642-12.600 ng/ml (Mittel 2148) (5), perniziöser Anämie mit Werten zwischen 48-1100 ng/ml (132), Sichelzellanämie mit Werten zwischen 70-2460 ng/ml (Mittel 367) (131) sowie Thalassämie (61, 63, 238, 259, 287) mit Werten zwischen 266-5504 ng/ml (61), 18-18191 ng/ml (Mittel 1130) (238), 440-23000 ng/ml (Mittel 5741± 791) (63), bzw. 5588±2767 ng/ml (259) gefunden, ferner mäßig starke Ferritinspiegel bei Erkrankungen der Leber, wie akuter Virushepatitis (5, 15, 60, 183) unter Verwendung der Überwanderungselektrophorese in 16,7% (15) und radioimmunologischer Methoden mit Werten zwischen 32-1250 ng/ml (Mittel 297) (5), bzw. 352-3840 ng/ml (Mittel 892) (60), chronisch aktiver Hepatitis mit Werten zwischen 340-1600 ng/ml (Mittel 738±231) (63), Fettleber mit Werten zwischen 252-496 ng/ml (Mittel 368) (5), mit Leberschädigung einhergehendem chronischen Alkoholismus (63, 115, 182) mit Werten zwischen 540-4200 ng/ml (Mittel 1870±414) (63), wobei die Höhe des Spiegels vom Ausmaß des Leberschadens abhing (182) sowie bei Leberzirrhose (5, 15) im Bereich zwischen 56-562 ng/ml (Mittel 301) (5), bzw. in der Gegenstromimmunelektrophorese in 60% bei Verwendung von Anti-Leberferritin, jedoch nur in 10% bei Verwendung von Anti-Plazentaferritin, bzw. Anti-Leukäm. Monozytenferritin (15), ferner bei Myokardinfarkt (31, 146, 147) mit Erhöhung vorwiegend des Ferritins vom Milz-Typ (146- 147), Herz-Typ (146) nicht jedoch vom Hela-Typ (147). Nach BIRGEGARD et al. (31) betrug der Anstieg des Serumferritins innerhalb der ersten Woche durchschnittlich 208%.

Gelegentlich erhöhte Spiegel finden sich bei chronischer Pankreatitis (213) und anderen akuten und chronischen Entzündungen (32, 60) sowie viralen und bakteriellen Infektionen (27, 29, 30, 260) und Hyperthyreose (186).

Eine Verminderung des Serumferritins wurde bisher außer bei Eisenmangelpatienten nur bei Zöliakie-kranken Kindern und Jugendlichen unter glutenhaltiger Ernährung festgestellt (266).

VICENTE et al. (277) konnten bei drei von sechs Patienten mit bakterieller Meningitis eine Vermehrung des Ferritins im Liquor ($19,61 \pm 9,5$ ng/ml) beobachten.

2.1.11.3 Maligne Erkrankungen Hepatom

Über die Norm erhöhte Serumferritin-Werte wurden beim Hepatom radioimmunologisch in 80% (137), 100% (5), bzw. bei Neger in 76% (159) gefunden. Stark erhöhte Werte über 1000 ng/ml konnten immerhin noch in 61% der Hepatomträger festgestellt werden, was AKAHONAI et al. (5) zu der Annahme veranlaßte, daß diese einen malignen Status der Leber anzeigen könnten. Untersuchungen von ASAKAWA et al. (15) mittels Überwanderungselektrophorese ergaben bereits im Jahre 1976 eine Abhängigkeit der Positivitätsrate im Serum von Hepatompatienten vom jeweils verwandten Antiserum, wobei mit Anti-Leber-Ferritin höhere Raten ($6/6 = 100\%$), als mit Anti-Plazenta-Ferritin (4/6), bzw. Anti-Pferdemilz-Ferritin (1/6) erzielt wurden. Bestimmungen im RIA unter Verwendung von Antiseren gegen Milz-, Leber- und HeLa-Ferritin ergaben neben der deutlichen Erhöhung der alkalischen Milz- (147), bzw. Leber-Typ-Ferritine eine nur geringe Erhöhung des sauren HeLa-Typ-Ferritins (147). Der von HAZARD und DRYSDALE (122) mittels absorbiertem HeLa-Ferritin-Antiserum in einem Einzelfall gemessene hohe Spiegel an saurem HeLa-Ferritin konnte bestenfalls hinweisgebend sein.

Nach AKAHONAI et al (5) existiert zwischen Serumferritin und AFP beim Hepatom keine Korrelation, während KEW et al. (159) bei Untersuchungen an Neger eine negative Korrelation beschrieben.

Pankreaskarzinom

Beim Pankreas-Ca wiesen in radioimmunologischen Untersuchungen 73% (213), bzw. 75% (137) der Patienten einen abnormal erhöhten Serumferritinspiegel auf; stark erhöhte Werte über 5000 ng/ml kamen nach ISHITANI et al. (137) bei 53% der Kranken vor. Ergebnisse von HAZARD et al. (122) zeigen neben einer Zunahme des alkalischen Leber-Typ-Ferritins eine deutliche Erhöhung des sauren HeLa-Typ-Ferritins (Kollektiv: drei Fälle).

Magenkarzinom

Bei elf Patienten mit Magen-Ca ohne Leber-Metastasierung lag das radioimmunologisch bestimmte Serum-Ferritin im Normbereich (bis 250 ng/ml). Erst bei Vorhandensein von Leber-Metastasen zeigten vier von fünf Fällen eine Erhöhung des Serumferritins über die Norm, davon drei mal über 500 ng/ml (ISHITANI et al., 137). Einen allgemeinen Anstieg des Serumferritins beim Vorliegen von Leber-Metastasen beschrieben auch AKAHONAI et al. (5). Die Bestimmung des Serumferritins scheint deshalb geeignet, beim Magenkarzinom Hinweise auf eine Metastasierung zu geben. Bei Unterscheidung von sauren und alkalischen Ferritinen im Serum konnte nur von HAZARD und DRYSDALE (122) in drei Fällen eine deutliche Erhöhung des HeLa-Typ-Ferritins festgestellt werden.

Andere Karzinome des Verdauungstrakts

Bei anderen Karzinomen des Verdauungstrakts, wie Ösophagus-Ca (137, 146, 147), Colon-Ca (137) und Rektum-Ca (15) konnten keine deutlichen Veränderungen der Serumferritin-Werte gefunden werden. Lediglich in je einem Einzelfall von Colon-Ca und Gallenblasen-Ca berichten HAZARD und DRYSDALE (122) über stark erhöhte Spiegel des HeLa-Typ-Ferritins.

Lungenkarzinom

Bei radioimmunologischen Untersuchungen von Lungenkarzinomen verschiedener Histologie wurde von LAMERZ (168) eine Erhöhung des Serumferritins in 77% (CEA in 53%, AFP in 0%), von ISHITANI et al. (137) in 61% festgestellt, wobei 35% über 500 ng/ml lagen.

Verschiedene Untersuchungen von GROPP et al. in der LAURELL-Elektrophorese unter Verwendung von Antiserum gegen Plazentaferritin ergaben eine Positivität in 66% (109), 72% (107) bzw. 68% (108). Falsch negativ bei Patienten ohne Metastasen waren Ferritin in 32% und CEA in 49% (108). In allen Fällen von Metastasen (44/44 $\hat{=}$ 100%) jedoch konnten signifikant erhöhte Ferritinspiegel entdeckt werden, während CEA in 15% (107) bzw. 19% (108) im Normbereich lag.

Nach Ansprechen auf die Therapie war ein Abfall hoher bzw. ein gleichbleibend geringer Spiegel, bei Nichtansprechen ein weiterer Anstieg bzw. Beharren auf hohem Niveau zu beobachten (108, 109). Die Serumferritinbestimmung wird von GROPP et al. (108, 109) sowohl als zusätzlicher Parameter zur Metastasendiagnostik als auch zur Verlaufskontrolle bei Therapie empfohlen. Zwischen der Höhe des Serumferritins und dem Stadium konnte keine sichere Korrelation entdeckt werden (137). In radioimmunologischen Untersuchungen konnten ISHITANI et al. (137) bei gleichzeitigem Einsatz von Ferritin- und CEA-Bestimmungen eine Erhöhung eines Parameters in ca. 90% aller Fälle im Gegensatz zu 62% bei Ferritin (Norm bis 250 ng/ml) bzw. 48% bei CEA (Norm bis 5 ng/ml) feststellen.

Bei Unterscheidung zwischen sauren und alkalischen Ferritinen fanden JONES et al. (147) nur in wenigen Fällen (3/15) eine geringe Erhöhung des HeLa-Typ Ferritins, während HAZARD und DRYSDALE (122) bei Verwendung von absorbiertem Antiserum gegen HeLa-Ferritin (in einem Einzelfall!) über eine massive Erhöhung des HeLa-Typ Ferritins berichteten.

Mammakarzinom

Im Gegensatz zu 41% präoperativer Patientinnen wiesen in einer radioimmunologischen Untersuchung von MARCUS und ZINBERG (190) unter Verwendung von Antiserum gegen Ferritin aus Lebermetastasen vom Mammakarzinom 67% der Patientinnen mit Lokalrezidiv oder Metastasen erhöhte Serumferritinspiegel auf. Niedrigwerte unter 10 ng/ml wurden allerdings nicht nur bei 45% der Frauen eines Normalkollektivs, sondern auch bei 25% der noch nicht operierten Patientinnen sowie 2% der Fälle mit Rezidiv bzw. Metastasen gemessen.

In einem Kollektiv von 229 Patientinnen früher Stadien (Stadium I und II) ermittelten JACOBS et al. (140) in einem relativ geringen Anteil von 25% erhöhte Serumferritinspiegel. Patientinnen mit Konzentrationen über 200 ng/ml fielen jedoch während der nachfolgenden vier Jahre durch eine höhere Rezidivneigung auf.

Untersuchungen von MICALI et al. (199) zufolge, nach denen Patientinnen mit regionaler Lymphknotenbeteiligung höhere Ferritinmittelwerte als solche ohne Lymphknotenmetastasen, jedoch niedrigere als Patientinnen mit Fernmetastasen aufwiesen, ist die Höhe des Serumferritinspiegels nicht repräsentativ für die Tumorgroße, aber für die regionale bzw. osteoviszzerale Tumorausbreitung.

Bei Unterscheidung zwischen sauren und alkalischen Ferritinen fanden HAZARD und DRYSDALE (122) in einem Kollektiv von vier Patientinnen stärker erhöhte Werte für HeLa-Typ-Ferritin als für Leber-Typ-Ferritin. JONES et al. (147) konnten bei 146 Patientinnen früher Stadien in 25% und bei 148 Patientinnen fortgeschrittener Stadien in 49% erhöhte Werte von HeLa-Typ Ferritin entdecken; allerdings wiesen auch 14% von 149 Frauen mit benignen Knoten in der Brust geringer erhöhte Spiegel an Ferritin vom HeLa-Typ im Serum auf.

Maligne Ovarial- und Hodentumore

Bei 67% von 109 untersuchten Patientinnen mit Ovarialtumoren verschiedener Histologie war nach LAMERZ (168) das Serumferritin über die Norm (bis 250 ng/ml) vermehrt (CEA in 20% erhöht, AFP normal), wobei 17% - vorwiegend Ovarialkarzinome Stadium III/IV - Werte über 1000 ng/ml aufwiesen. Nach vollständiger operativer Tumorentfernung fand ein Absinken der Werte in Richtung der Normwerte statt, während sie bei Progredienz sistierten oder weiter anstiegen.

Bei Hodentumoren verschiedener Histologie lagen in Abwesenheit von Metastasen die Serumferritinwerte aller 19 untersuchten Patienten im Normbereich, während bei Vorliegen von lymphogener bzw. hämatogener Metastasierung (19 Fälle) 63,2% der Serumferritinwerte (AFP 42,0%, beta-HCG 63,2%) die Norm überschritten (179), wobei Serumferritin und Serum-LDH eine hochsignifikante Korrelation zeigten. Nach Einführung der Serumferritinbestimmung bei Hodentumoren zusätzlich zur AFP- und beta-HCG-Bestimmung konnte eine Steigerung der Treffsicherheit in der Metastasendiagnostik um 11% auf 84,2% erzielt werden.

Der Einsatz der Serumferritinbestimmung bei Keimzelltumoren als dritter Marker neben AFP und beta-HCG für die Therapie- sowie Verlaufskontrolle zur Früherkennung von Rezidiven bzw. eintretender Metastasierung wird auch von GRAIL et al. (102) gefordert. Messungen je eines Einzelfalls (!) von Teratoblastom bzw. Ovarialkarzinom ergaben bei HAZARD und DRYSDALE (122) eine Erhöhung des Ferritins vom HeLa-Typ.

Akute myeloische Leukämie (AML)

Über die Norm (bis 250 ng/ml) erhöhte Werte wurden in einem Kollektiv von 14 Patienten mit AML radioimmunologisch in 100%, stark erhöhte Werte (über 500 ng/ml) in 85% der Fälle gemessen (137). Enzymimmunologische Untersuchungen an neun anderen Patienten mit AML ergaben ebenfalls in allen Fällen erhöhte

Werte (Norm bis 170 ng/ml) (226). Neben angestiegenen Werten des Ferritins vom Milz-Typ bestand nach JONES (147) bei erstmaliger Vorstellung in 40%, bei Remission in 48% (!) und bei Rückfall in 79% eine Vermehrung des Ferritins vom HeLa-Typ im Serum.

Akute Lymphatische Leukämie (ALL)

Untersuchungen bei 18 Patienten mit ALL ergaben enzymimmunologisch in 72% der Fälle erhöhte Ferritinwerte im Serum (Norm bis 170 ng/ml) (226). An ALL leidende Kinder wiesen nach KOLLER et al.(163) vor Therapiebeginn bzw. im Rückfall bei einem Mittelwert von 636 ng/ml in 100% über die Norm (bis 31 ng/ml) erhöhte Werte auf. Bei erfolgreicher Therapie fiel der ursprünglich hohe Wert von durchschnittlich 265 ng/ml (49-1300 ng/ml) nach drei Monaten auf 161 ng/ml (35-364 ng/ml). Längere Zeit nach Beendigung der Therapie (vier Monate bis vier Jahre) betrug das Serumferritin im Mittel nur noch 23 ng/ml (4-100 ng/ml). Anhand eines niedrigen Serumferritinspiegels konnte jedoch ein bevorstehender Rückfall nicht sicher ausgeschlossen werden.

PARRY et al. (228) kam nach Beobachtung von 202 ALL-Patienten (im Alter von zwei bis 28 Jahren) zu der Erkenntnis, daß die innerhalb von sechs Monaten nach Beginn einer Remission ermittelten Ferritinkonzentrationen im Serum nicht mit der Dauer der Remission korrelierten. Aufgrund des Abfalls stark erhöhter Serumferritinspiegel von durchschnittlich 2512 ± 266 ng/ml bei unbehandelten bzw. im Rückfall befindlichen Patienten auf 1622 ± 152 ng/ml nach ein bis sechs Monaten, 363 ± 21 ng/ml nach sieben bis zwölf Monaten und schließlich 138 ± 14 ng/ml nach über ein Jahr andauernder Remission wird jedoch von MATZNER et al. (198) die Serumferritinbestimmung zur Bewertung des Therapieerfolges empfohlen.

Zwischen der Rückfallrate von ALL-Kindern mit vermehrtem HeLa-Typ-Ferritin bzw. von denen mit Normalwerten besteht nach JONES et al. (147) kein signifikanter Unterschied.

Chronisch Myeloische Leukämie (CML)

Bei einem Kollektiv von 15 Patienten wiesen in einer radioimmunologischen Untersuchung nach ISHITANI et al. (137) 40% einen über die Norm (bis 250 ng/ml) erhöhten Spiegel auf, während es in einer 13 Fälle umfassenden Gruppe 77% der enzymimmunologisch untersuchten Patienten waren (Norm bis 170 ng/ml) (226). MATZNER et al. (198) konnten in einem unbehandelten Kollektiv Mittelwerte von 295 ± 35 ng/ml, einem behandelten von 129 ± 21 ng/ml und bei Vorliegen einer Blastenkrise von 1905 ± 174 ng/ml ermitteln. Nach LANG et al. (172) korreliert hierbei die Höhe des Serumferritins klar mit der Einschränkung der Erythropoese, nicht jedoch mit der Masse an Blasten oder Leukozyten. Da dem Ausmaß der Dyserythropoese allerdings eine prognostisch wichtige Bedeutung bei der Beurteilung der CML zukommt, wird die Serumferritinbestimmung als ein einfach zu bestimmender und bedeutender Parameter in der Verlaufskontrolle der CML angesehen.

Chronisch Lymphatische Leukämie (CLL)

Bei CLL wurden von PAGE et al (226) in enzymimmunologischen Untersuchungen in 52% (Norm bis 170 ng/ml), in radioimmunologischen Tests von OERTEL et al. (217) jedoch in 0% (Norm bis 200 ng/ml) erhöhte Spiegel ermittelt. Von JONES et al. (149) wurden Mittelwerte zu 234 ± 114 ng/ml, von BOLARIN (35) bei Negern zu 7233 ± 6653 ng/ml angegeben.

M. Hodgkin

Patienten mit M.Hodgkin wiesen nach enzymimmunologischen Bestimmungen von PAGE et al. (226) in 69% (Norm bis 170 ng/ml), nach Messungen mittels Überwanderungselektrophorese durch BIEBER und BIEBER (25) in 44% erhöhte Ferritinwerte im Serum auf.

Von verschiedenen Untersuchern wurde eine Abhängigkeit der Serumferritinwerte vom jeweiligen Stadium (25, 75, 142, 149, 217) und dem Vorhandensein systemischer Manifestationen (142, 149), nicht jedoch vom jeweils histologischen Typ der Erkrankung beobachtet (75, 142, 198).

MATZNER et al. (198) zufolge betrugen die Mittelwerte 316 ± 34 ng/ml bei unvollständigen und 74 ± 15 ng/ml bei vollständigen Remissionen im Gegensatz zu 1380 ± 158 ng/ml in den unbehandelten Stadien III und IV bzw. im Rückfall, weshalb von diesem, wie auch nach eigenen Ergebnissen von DÜRNER et al. (75) die Serumferritinbestimmung bei Hodgkin-Erkrankten zur Therapiekontrolle empfohlen wird.

Eine besondere Bedeutung scheint hierbei nach Ergebnissen von CAZZOLA et al. (59) der Unterscheidung zwischen den sog. sauren und alkalischen Ferritinen zuzukommen: Erhöhte Werte des Serumferritins vom Leber-Typ waren mit niedrigem Serumeisen verknüpft und wurden nahezu nur bei Patienten mit systemischen Symptomen entdeckt, was als prognostisch ungünstiger Faktor angesehen wird. Eine Vermehrung des Serumferritins vom Hela-Typ bestand jedoch unabhängig von Veränderungen des Eisenhaushalts bzw. vom Auftreten systemischer Symptome bei 94% aller unbehandelten Patienten. Während die Spiegel alkalischer Isoferritine unmittelbar nach Eintreten einer vollständigen Remission auf das normale Niveau zurückkehrten, geschah dies bei den sauren Ferritinen erst nach ein bis zwei Jahren.

Andere maligne Lymphome

Bei der Untersuchung von Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen konnten MATZNER et al. (198) sehr stark erhöhte Mittelwerte beim aktiven Histiozytischen Lymphom (2512 ± 28 ng/ml), weniger beim aktiven Lymphozytischen Lymphom (170 ± 29 ng/ml) und beim aktiven gemischt Histiozytisch-Lymphozytischen Lymphom (372 ± 49 ng/ml) feststellen, wobei außer im Falle des lymphozytischen Lymphoms insbesondere bei Eintritt einer vollständigen Remission ein starker Abfall des Serumferritin-Spiegels zu beobachten war.

60% der Patienten mit Burkitt-Lymphom wiesen nach BOLARIN (35) einen über die Norm erhöhten Ferritinspiegel im Serum auf, wobei die Patienten mit abdominaler Manifestation wesentlich höhere Mittelwerte (1324 ± 216 ng/ml) aufwiesen als solche mit fazialer Manifestation (333 ± 260 ng/ml).

ISHITANI et al. (137) fanden in 36% (vier von elf) der Patienten mit Multiplen Myelom die Norm übersteigende Werte. Über einen bei diesen, nicht aber bei Gesunden vorkommenden circadianen Rhythmus des Serumferritins wird von NERI et al. (210) berichtet.

Bei Lymphoproliferativen Erkrankungen mit ZNS-Beteiligung fanden VICENTE et al. (277) einen Anstieg des Ferritins im Liquor auf $21,95 \pm 5,60$ ng/ml im Gegensatz zu lymphoproliferativen Erkrankungen ohne ZNS-Beteiligung ($8,22 \pm 1,39$ ng/ml) und Normalpersonen ($5,78 \pm 0,60$ ng/ml).

Andere Malignome

Erhöhungen der Serumferritinspiegel fanden sich auch in 16% der Fälle von Urogenital-Ca (Norm bis 250 ng/ml) (137), 51% Cervix-Ca (Norm bis 108 ng/ml), wobei sowohl 75% der Patientinnen mit erhöhtem Serumferritin, als auch 15% derer mit Werten im Normbereich Lymphknotenmetastasen bzw. eine parametrale Invasion aufwiesen (138), weiterhin in 41% der Fälle von Neuroblastom (Gegenstromimmunelektrophorese, positiv ab ca. 400 ng/ml) (117), bei Malignem Melanom (181), nicht jedoch bei Wilms-Tumor (117).

Serumferritin bei malignen Erkrankungen (ng/ml)

	N	Mittelwert	Bereich	%	obere Normgrenze	Methode (*)	Ref.	Bemerkungen
Hepatom	9		300-15.000 2- 28	11	2	RIA (Milz) RIA (HeLa)	147	
	18	1755 ¹	376- 4.232	100	300	IRMA ⁴	5	
				61	1000			
	10			80	250	IRMA (Leber)	137	
	10	1233 ¹ ± 700				IRMA ⁵	35	
	76	845 ² ± 800 ³	30-25.600	76	300	RIA	159	
	1		560 850			RIA (Leber) RIA (HeLa)	122	
Pankreas- karzinom	3		320- 600 500- 1.900			RIA (Leber) RIA (HeLa)	122	
	32			75	250	IRMA (Leber)	137	
				53	500			
	22	453 ¹ ± 78		73		IRMA ⁶	213	
Magen- karzinom	4	31 ± 29				IRMA (Leber) IRMA (Herz)	146	
			< 10					
	6		25- 365 < 2- 6	1/6	2	RIA (Milz) RIA (HeLa)	147	
	38	183 ¹	12- 683			IRMA ⁴	5	ohne Lebermetastasen
	12	522 ¹	86- 2.081					mit Lebermetastasen
	3		118- 750 235- 1.750			RIA (Leber) RIA (HeLa)	122	
	11				250	IRMA (Leber)	137	ohne Lebermetastasen
Ösophageus- karzinom	2		48 - 183 < 10 - 23			IRMA (Milz) IRMA (Herz)	146	
	3		38 - 183 < 2	0	2	RIA (Milz) RIA (HeLa)	147	
	3			0	250	IRMA (Leber)	137	
	5			0/5	250	IRMA (Leber)	137	
	1		220 1500			RIA (Leber) RIA (HeLa)	122	
Bronchial- karzinom	15		25- 1.190 < 2 - 3			RIA (Milz) RIA (HeLa)	147	
	111			77	250	IRMA ⁴	168	
	1		630 1750			RIA (Leber) RIA (HeLa)	122	
	34			61	250	IRMA (Leber)	137	
				35	500			
	50			66		Laurell-El.phor. (Plazenta)	109	
	81			72		"	107	
Mamma- karzinom	44			100		"	108	mit Metastasen
	100			68				
	10	33 ¹ ± 16 480 ± 369				IRMA (Herz) IRMA (Milz)	146	vor Behandlung
	19	10 ¹ ± 10 84 ± 109				IRMA (Herz) IRMA (Milz)		nach Behandlung
	149	44 ³	4 - 322 < 2 - 15	14	2	RIA (Milz) RIA (HeLa)	147	benigne Knoten
	146	48 ³	3 - 1313 < 2 - 17	25	2	RIA (Milz) RIA (HeLa)		Karzinom-Frühstadium
	148	132 ³	6 - 8360 < 2 - 53	49	2	RIA (Milz) RIA (HeLa)		Karzinom-Spätstadium
	38	199 ¹	10 - 1394	41	146	RIA (Lebermet. 190 von Mammekarz.)		präoperativ
	97	671 ¹	10 - 5875	67				Rezidiv
	4		50 - 330 140 - 800			RIA (Leber) RIA (HeLa)	122	
	8	687 ¹ ± 245				IRMA ⁵	35	
	229	97 ¹		25	120	RIA	140	

Tabelle 7 (1)

	N	Mittelwert	Bereich	%	obere Normgrenze	Methode (*)	Ref.	Bemerkungen
	16	52 ¹	17			RIA	199	Stadium T ₁₋₂ N ₀ M ₀
	20	102 ¹	27					T ₁₋₂ N ₀ M ₀
	9	41 ¹	8					T ₁₋₂ N ₁ M ₀
	12	96 ¹	39					T ₁₋₂ N ₀ M ₀
	9	288 ¹	78					T ₁₋₂ N ₁ M ₁
maligner Hcdentumor	19			0	330	IRMA ⁴	179	ohne Metastasen mit
	19			63	330			
	1		1550			RIA (Leber)	122	Teratoblastom
			1000			RIA (HeLa)		
maligner Ovarialtumor	109			67	250	IRMA ⁴	168	
				17	1000			
	1		62			RIA (Leber)		
			430			RIA (HeLa)	122	
akute myel. Leuk. (AML)	45	674 ³	66-8380			RIA (Milz)	147	vor Behandlung
			< 2- 41	40	2	RIA (HeLa)		
	48	566 ³	27-6126			RIA (Milz)		in Remission
			< 2- 16	48	2	RIA (HeLa)		
	19	2040 ³	81-8815			RIA (Milz)		bei Rückfall
			< 2- 33	79	2	RIA (HeLa)		
	11	1825 ¹	338-5874			IRMA ⁴	5	
	2		1675-1866			RIA (Leber)	122	
			< 100- 135			RIA (HeLa)		
	35	589 ¹ + 66	155-2200			IRMA	149	
	17	716 + 364	140-1250			RIA ⁷	268	
	14			100	250	IRMA (Leber)	137	
				85	500			
	9	503 ¹		100	170	EIA (Leber)	226	
	8	317 ²	282- 376			RIA	264	(Kinder), aktiv
		195 ²	50- 799					inaktiv
	9	1156 ¹ + 324	720-1320			RIA ⁷	268	
akute Lymph. Leuk. (ALL)	100		< 2- 15	37	2	RIA (HeLa)	147	(Kinder) gesamt
	88		< 2- 15	35	2			in Remission
	12		< 2- 8	47	2			bei Rückfall
	2		3800-34670			RIA (Leber)	122	
			130- 165			RIA (HeLa)		
	11	238 ²				RIA	264	(Kinder) vor Behandl.
	15	338 ²						in Remission
	30	109 ²						bei Rückfall
	10	302 ¹ + 271	130-1040			RIA ⁷	268	
	16	636 ¹	49-4945	100	31	RIA ⁶	163	vor Behandlung
	13	133 ¹	7- 610					in Remission
	18	427 ¹		72	170	EIA (Leber)	226	
	25	2512 ¹ + 266				IRMA	198	Rückfall
	26	1622 ¹ + 152						Remission 1-6 Mo.
		363 ¹ + 21						7-12 Mo.
		138 ¹ + 14						1 Jahr
chron. myel. Leuk. (CML)	7	312 ¹	110-1056			IRMA ⁴	5	
	10	295 ¹ + 35				IRMA	198	vor Behandlung
	13	129 ¹ + 21						in Remission
	11	1905 ¹ + 174						bei Blastenkrise
	15			40	250	IRMA (Leber)	137	
	13	287 ²		77	170	EIA (Leber)	226	
chron. Lymph. Leuk. (CLL)	3	7233 ¹				IRMA ⁵	35	
	7	234 ¹ + 114	25- 880			IRMA	149	
	42	322 ¹		52	170	EIA (Leber)	226	
	13			0	200	IRMA	217	
M. Hodgkin	4	3960 ¹				IRMA ⁵	35	
	51	175 ²	12-2100	37		RIA (Leber)	59	vor Behandlung
		103 ²	30-1000	94		RIA (HeLa)		
	23	67 ²	14- 230	0		RIA (Leber)		in Remission
		72 ²	21- 570	74		RIA (HeLa)		
	5	77 ²	27- 165	0		RIA (Leber)		in Teilremission
		188 ²	145- 220	100		RIA (HeLa)		
	25	143 ²	21-1268	36		RIA (Leber)		bei Rückfall
		131 ²	25- 750	88		RIA (HeLa)		

Tabelle 7 (2)

	N	Mittelwert	Bereich	%	obere Normgrenze	Methode (*)	Ref.	Bemerkungen
	19	215 ¹ _{± 44} 195 ¹ _{± 157} 238 ¹ _{± 69} 137 ¹ _{± 26} 385 ¹ _{± 99}	66- 720			IRMA	149	gesamt Stadium I, II Stadium III, IV ohne system. Manifest. mit system. Manifest.
	46	1380 ¹ _{± 158}				IRMA	198	vor Behandlung in Teilremission in Remission
	22	316 ¹ _{± 34}						
	20	74 ¹ _{± 15}						
	8			50	250	IRMA (Leber)	137	
	18	420 ¹	63-2175			IRMA	142	Stadium I
	30	486 ¹	25-2238					II
	54	602 ¹	18-4828					III
	22	1107 ¹	70-7303					IV
	60	335 ¹	35-2715					ohne system. Manifest.
	64	840 ¹	18-7303					mit system. Manifest.
	43	737 ¹	63-4828					lymphozytenreich
	48	446 ¹	25-4048					nod. skleros.
	15	537 ¹	18-2524					mischzellig
	10	838 ¹	80-2295					lymphozytenarm
	13	283 ¹		69	170	EIA (Leber)	226	
	40			20	300	IRMA	217	
	3	243 ¹	38- 600			IRMA ⁴	75	Stadium I
	11	105 ¹	28- 235					II
	19	378 ¹	128- 470					III
	14	831 ¹	95-1700					IV
Burkitt- Lymphom	10	729 ¹ _{± 561}		60		IRMA ⁵	35	gesamt
	6	333 ¹ _{± 260}						fazialer Typ
	4	1324 ¹ _{± 216}						abdominaler Typ
Non-Hodgkin- Lymphom	13	2512 ¹ _{± 28}				IRMA	198	histiozytär: aktiv
	13	32 ¹ _{± 7}						in Remission
	40	170 ¹ _{± 29}						lymphozytär: aktiv
	12	105 ¹ _{± 29}						in Remission
	28	372 ¹ _{± 49}						histio-lymphozyt: aktiv
	20	105 ¹ _{± 22}						in Remission
malignes Melanom	35	128 ¹ _{± 80}				IRMA	181	Stadium I
	34	292 ¹ _{± 171}						II
	22	1106 ¹ _{± 665}						III

1 = arithmetisches Mittel

2 = geometrisches Mittel

3 = Median

kommerzielle Kits:

4 = RIA-Gnost Ferritin, BEHRINGWERKE AG, Marburg

5 = IRMA NORDICLAB, Oulu, Finnland

6 = Fer-Ion kit, RAMCO Lab., U.S.A.

7 = Apec^M ferritin kit, DAICHI RADIOISOTOPE Lab., Tokyo, Japan

% = Anteil der Serumferritinwerte, welche die obere Normgrenze übersteigen;

(*) = Ferritinquelle bzgl. Herstellung von Tracer, Antikörper und Standard

Indikation zur Serumferritin-Bestimmung

	Screening	Diagnostik	Prognose	Therapie- und Verlaufs- beurteilung
Benigne Erkr.:				
Eisenmangel	+	+		+
Eisenüberladung	(+)	+		+
Anämie (hypochrome)		+		
Maligne Erkr.:				
Hepatozell. Karzinom		?		
Pankreaskarzinom		?		
Magenkarzinom		(Meta.?)		
Lungenkarzinom		(Meta.?)		+
Mammakarzinom		(Meta.?)	+	
Ovarialtumor				+
Hodentumor		(Meta.?)		+
AML				+
ALL				+
CML			+	+
CLL				+
M.Hodgkin			+	+

Tabelle 8

2.2 Eigene Untersuchungen

2.2.1 Methodik

2.2.1.1 Analytische Verfahren

Gesamt-Eiweiß

Die Gesamt-Eiweißbestimmung wurde nach der Methode von BRADFORD (40) als Mikroprotein-Assay (Bereich 1-10µg Protein/100µl; Coomassie-Reagenz¹⁾ durchgeführt und bei 595nm im Spektralphotometer²⁾ abgelesen.

Zweidimensionale Doppeldiffusion (OUCHTERLONY)

Die zweidimensionale Doppeldiffusion nach OUCHTERLONY (224) wurde auf Objektträger, welche mit 2%igem DIFCO-Agar³⁾ und Cialit-Zusatz beschichtet worden waren, durchgeführt. Es wurden mit speziellen Stanzen⁴⁾ sechs bzw. acht rosettenförmig um ein zentrales Reservoir angelegte Reservoire (Ø 2-4mm, Inhalt 10-15µl) geschaffen, welche mit jeweils entsprechenden Antigen-, bzw. Antikörperlösungen beschickt wurden. Nach einer Diffusionszeit von 24-48 Stunden wurden die Präparate in physiologischer Kochsalzlösung gewässert (24 Stunden), getrocknet, mit Azokarmin gefärbt und in Eisessig-Methanol-Lösung (1:10) entfärbt. Diese Methode wurde vor allem zur Prüfung der Reinheit von Antigen- und Antikörperpräparationen eingesetzt.

Qualitative Polyacrylamidgel-Isoelektrofokussierung

Die qualitative Isoelektrofokussierung erfolgte in 4%igem Polyacrylamidgel⁵⁾ mit Trägerampholyten im pH-Bereich 4-6,5. Die Auftragsmenge der Proben betrug jeweils ca. 15µl bei einer Proteinkonzentration von 1-5µg/ml. Die Auftrennung wurde in der

1) Fa. BIO-RAD Lab., München

2) DB Spektr. Photometer, Fa. BECKMAN Instr., München

3) Fa. DIFCO Lab., Detroit, USA

4) Fa. BOSKAMP, Hersel b. Bonn

5) Fa. LKB, Bromma, Sweden

Multiphor-Kammer¹⁾ bei einer Leistung von konstant 15W sowie maximal 2000V bzw. 250 mA durchgeführt. Die Temperatur betrug 10°C, als Kühlmittel diente Kerosin. Nach einer Laufzeit von drei Stunden erfolgten Fixierung in Trichloressigsäurelösung (30 min.), Proteinfärbung in Perchlorsäure-Coomassie-Lsg. (1 Stunde), Entfärbung in Eisessig-Methanol-Lösung, Wässern und Trocknen.

Radioimmunoassay

Markierung und Reinigung des markierten Proteins

Die radioaktive Markierung des Ferritins wurde sowohl nach der Chlormain T-Methode von HUNTER (130), als auch nach der Methode der indirekten Konjugation von BOLTON und HUNTER (37) vorgenommen.

Chloramin T-Methode

Prinzip: Das Oxidationsmittel Chloramin T führt Jodid in das reaktive Jod über, welches vorwiegend an die Tyrosingruppen des zu markierenden Proteins gebunden wird. Durch Zusatz des Reduktionsmittels Na-Disulfit kann diese Reaktion augenblicklich unterbrochen werden. Dabei sind die eingesetzten Mengen von Chloramin T, Na-Disulfit und Na-Jodid sowie die Reaktionszeit möglichst niedrig zu halten, um einer unnötigen Beeinträchtigung der immunologischen Reaktionsfähigkeit des Proteins vorzubeugen.

Durchführung: Vor der Markierung wurde die Menge von 1 mCi Na-125J im Versandgefäß²⁾ mit 70 µl 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,5 verdünnt. Mit Eppendorfpipetten wurden nacheinander in ein 1ml-Reaktionsgefäß folgende Substanzen zusammengegeben, wobei die Mischung vorsichtig auf einem Spezial-Schüttler³⁾ durchgeführt wurde:

20 µl Ferritin-Lösung $\approx$ 5 µg Ferr. pp₂b (BC-DEAE) in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5

10 µl 0,5 M Phosphatpuffer pH 7,5

1) Fa. LKB, Bromma, Sweden

2) Fa. HÜCHST AG, Frankfurt

3) Fa. EPPENDORF, Hamburg

20 μ l Na- ^{125}J -Lösung $\approx 0,3-0,45$ mCi

20 μ l Chloramin T ≈ 50 μ g in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5

Nach Mischung Inkubation über 25-40 Sekunden, anschließend Zugabe von

25 μ l Na-Disulfit ≈ 12 μ g in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5

200 μ l 0,05 M Phosphatpuffer mit 2% bovinem Serumalbumin (BSA)

Das gesamte Gemisch wurde zur Abtrennung von nicht gebundenem ^{125}J auf einer Sephadex G 50 fine-Säule¹⁾ (1,0 x 15,0 cm, mit 1 ml Veronalpuffer + 2,5% BSA vorbehandelt) chromatographiert. Eluiert wurde mit 0,07 M Veronalpuffer pH 8,6. Das Eluat wurde mittels eines Fraktionskollektors in 1 ml-Portionen in kleinen Eppendorfgefäßen (bereits 0,2 ml Veronalpuffer + 2,5% BSA enthaltend) gesammelt und die Aktivität der einzelnen Fraktionen einschließlich der verlorenen Aktivität (Reaktionsgefäß, Pipettenspitzen) in einem Gamma-Zähler²⁾ ermittelt. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden auf einer Sepharose 4B-Säule¹⁾ (1,5x33,5 cm) mit o.g. Puffer rechromatographiert und wieder in 1 ml-Portionen gesammelt. Anhand eines Diagramms, in welches die gemessenen Aktivitäten der einzelnen Fraktionen eingezeichnet worden waren, wurde der Inhalt mehrerer Röhrchen zu Sammelfraktionen gepoolt, welche mit RIA-Verdünnungspuffer (0,1 M Phosphatpuffer + 0,15 M NaCl + 1% BSA + 0,4% EDTA-Titriplex, pH 8,2) soweit verdünnt wurden, daß in 100 μ l mit einem empfindlichen RIA-Gammazähler³⁾ etwa 30.000 counts/min. gemessen wurden, und in 10ml Portionen bei 4°C gelagert.

Methode nach BOLTON und HUNTER

Prinzip: Das ^{125}J wird nach der Chloramin T-Methode an 3-(p-Hydroxyphenyl)Propionsäure-N-Succinimidester (= BOLTON-HUNTER-Reagenz) gekoppelt (Reaktion I). Dieser Komplex (^{125}J -BOLTON-HUNTER-Komplex) wird in einer weiteren Reaktion an die freien

1) Fa. PHARMACIA, Uppsala, Sweden

2) Fa. TELEFUNKEN

3) Wallac 80.000 Gamma Sample Counter, Fa. LKB, Bromma, Sweden

Aminogruppen des zu markierenden Proteins konjugiert (Reaktion II). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß die nach der Chloramin T-Methode durchgeführte Markierung der o.g. Ester-Verbindung vor der Konjugatsbildung stattfindet und daher das Protein mit dem Oxidationsmittel nicht direkt in Berührung kommt.

Durchführung: Die Markierung des Ferritins wurde mit bereits fertig bezogenem, in CHCl_3 gelöstem BOLTON-HUNTER-Reagenz¹⁾ vorgenommen. Dazu wurde das Lösungsmittel unter Stickstoffzufuhr und Reinigung der Dämpfe durch eine Aktivkohle-gefüllte Entlüftungspatrone im Abzug verdunstet. Anschließend wurde das zu markierende Ferritin (10 µg in 100 µl 0,1 M Boratpuffer pH 8,5) mit Eppendorfpipetten zugegeben und 30 min unter gelegentlichem Mischen inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Gemisch mit 200 µl 0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 7,4 verdünnt, mit 100 µl 0,05 M Na-Phosphatpuffer pH 7,4 + 1% BSA stabilisiert und über eine HPLC UltroPac TSK G 4000 SWG-Säule²⁾ (21,5 x 600 mm) chromatographiert, wobei Aktivität und Absorption bei 280 nm kontinuierlich registriert wurden.

Testung des ersten Antikörpers (Antikörperverdünnungsreihe)

Prinzip: Die Antikörperverdünnungsreihe dient der Ermittlung einer geeigneten Verdünnung des 1. Antikörpers für die Standard-Inhibitionskurve des Radioimmunoassays. Dazu wird eine geometrische Verdünnungsreihe des 1. Antikörpers mit jeweils konstanten Mengen Tracer versetzt und nach einer Inkubationsphase von 16-24 Stunden bei Raumtemperatur (R.T.), Zugabe des 2. Antikörpers (Anti-Kaninchen-Gammaglobulin von der Ziege), erneuter Inkubation von 16-24 Stunden (R.T.), Zentrifugation und Dekantierung des Überstandes im Gamma-Zähler die gebundene Radioaktivität gemessen. Die unspezifische Bindung, d.h. die Menge an Radioaktivität, welche allein durch den 2. Antikörper, durch Fällungsvorgänge oder durch einfache Adsorption an die Gefäßwand bindet, wird durch den N-Wert angezeigt. Als für den RIA

1) Fa. HÖCHST AG, Frankfurt

2) Fa. LKB, Bromma, Sweden

am besten geeignete Verdünnung des 1. Antikörpers ist diejenige zu betrachten, welche zu einer Bindung von 30-50% der zugeführten Gesamtaktivität führt.

Durchführung: Als geeignete Verdünnung des markierten Antigens (Tracer) wurde nach Vormessungen und Berechnungen auf eine Count-Zahl von 15.000-20.000 counts/min und 100µl im für den Test verwandten Gamma-Zähler eingestellt. Der 2. Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:15 zupipetiert.

In jeweils zwei Polystyrolröhrchen (15x55 mm)¹⁾ wurden folgende Volumina pipettiert (RIA Verdünnungspuffer: 0,01M Phosphatpuffer + 1% BSA + 0,9% NaCl + 0,4% EDTA-Titriplex, auf pH 8,2 eingestellt mit 1N NaOH):

- a) Total: 100µl Ferritin* (¹²⁵J-Ferritin) + 1/400 Kaninchenserum
- b) N-Wert: 200µl RIA-Verdünnungspuffer (incl. 30% Pferdeserum)
200µl RIA-Verdünnungspuffer
100µl Ferritin* + 1/400 Kaninchenserum
- c) Proben: 200µl RIA-Verdünnungspuffer + 30% Pferdeserum
100µl RIA-Verdünnungspuffer
100µl 1. Antikörper aus der geometrischen Verdünnungsreihe
100µl Ferritin* + 1/400 Kaninchenserum

Nach gründlichem Mischen auf einem VORTEX-Mixer²⁾ und einer Inkubation von 16-24 Stunden (R.T.) wurden zu allen Röhrchen (außer "Total") je 100µl des 2. Antikörpers (Anti-Kaninchengammaglobulin v.d. Ziege³⁾ 1:10 mit RIA-Puffer verdünnt) zugegeben. Nach erneutem Mischen und Inkubieren (16-24 Stunden, R.T.) wurden die Röhrchen (außer T) für 30 min. (R.T.) bei 3000 UpM (1000g) zentrifugiert, nach Dekantieren umgekehrt zum Abtropfen auf einen saugfähigen Karton gestellt und anschließend mit Filterpapier sorgfältig innen ausgewischt, ohne das Präzipitat zu berühren. Anschließend wurde die in den Röhrchen verbliebene Radioaktivität im Gamma-Zähler für eine Dauer von 60 sec. gemessen.

1) Fa. BOLL, München

2) Fa. BENDER & HOBEIN, München

3) Fa. BEHRINGWERKE, Marburg

Durchführung des Radioimmunoassays

Der Ferritin-Test wurde als direkter Test mit unbehandelten Patientenseren durchgeführt.

Als Standards dienten

- a) ein kommerzieller Ferritin-Standard (Leber)¹⁾ in den Konzentrationen 500; 200; 75; 25; 10; 5 ng/ml
- b) eine alkalische Fraktion (pp_{2a}) von Plazentaferritin aus eigener Präparation in geometrisch abnehmender Konzentration 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1; 1,5 ng/ml
- c) eine saure Fraktion (pp_{2d}) von Plazentaferritin aus eigener Präparation in geometrisch abnehmender Konzentration 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1; 1,5 ng/ml

sowie RIA-Puffer für den Leerwert.

Als Doppelbestimmung wurden folgende Volumina pipettiert:

- a) Total und
- b) N-Wert wie oben
- c) Standardkurve
 - 200µl RIA-Verdünnungspuffer (+30% Pferdeserum)
 - 100µl Standardlösung (in oben angegebenen Konz.)
 - 100µl 1. Antikörper der ermittelten Verdünnung
 - 100µl Ferritin* + 1/400 Kaninchenserum
- d) Analysenproben
 - 200µl RIA-Verdünnungspuffer (ohne Pferdeserum)
 - 100µl Probe (Serum)
 - 100µl 1. Antikörper (wie oben)
 - 100µl Ferritin* + 1/400 Kaninchenserum

Nach gründlichem Mischen und anschließender Inkubation (s.o.) wurde wie bei der Antikörperverdünnungsreihe verfahren. Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit wurden pro Testanz vier Kontrollseren verschiedener Ferritinkonzentrationen mitgeführt.

1) Fa. BECTON & DICKINSON, Orangeburg, N.Y.

2.2.1.2 Präparative Verfahren

Gewebe-Extraktion

Plazenta

Die einzelnen reifen Plazenten wurden unmittelbar post Partum bei -40°C tiefgefroren. Insgesamt wurden 12,5kg (entsprechend 32 Plazenten) Gewebe verarbeitet.

Nach langsamem Auftauen über Nacht bis 4°C wurden die Plazenten von Eihäuten und Nabelschnüren freipräpariert, mit dem Messer zerkleinert und unter Zusatz von 2,5l physiologischer Kochsalzlösung ($+1,4\text{g NaN}_3$) im Braun Multimix¹⁾ zu einem Gewebsbrei verarbeitet, welcher in 400 ml-Portionen in einem VIRTIS "60" Homogenizer²⁾ mit rhomboiden Schermessern bei einer Umdrehungszahl von 15.000 Upm über 30 min bei 4°C homogenisiert wurde. Nach vierstündiger Inkubation (4°C) wurden jeweils $2 \times 0,5\text{l}$ -Portionen des Homogenats unter ständigem Umrühren im Wasserbad auf eine Temperatur von $70-75^{\circ}\text{C}$ erhitzt, welche für genau 10 min aufrecht erhalten wurde. Nach Abkühlung im Eiswasserbad bis auf 4°C erfolgte eine Zentrifugation bei 36.000g (19.000 Upm)³⁾ für 60 min, worauf das Präzipitat nach immunologischer Prüfung einer Suspension ($0,9\%\text{NaCl}$) auf Ferritin im OUCHTERLONY-Doppeldiffusions-Test bei negativem Ergebnis verworfen wurde. Mittels des AMICON-Systems⁴⁾ wurde anschließend über eine mit der Ultrafiltrationsmembran XM 300 ($\varnothing 72\text{ mm}$; Protein-MG-Retention um ca. 300.000) bestückte Ultrafiltrationszelle (UF 400) eine Einengung des Überstandes auf ca. $1/20$ des Ausgangsvolumens vorgenommen. Die ca. 3-5 Tage pro 4l (max. Inhalt des Vorratsgefäßes) dauernde Einengung wurde bei 4°C durchgeführt und durch ein Sicherheitskontrollsystem (Endpoint controller EC 20) vor unbeabsichtigter Überkonzentrierung geschützt. Bei einem Endvolumen von 200 ml wurde dieses aus der Zelle abgesaugt, in kleine Dialyseschläuche⁵⁾ (Kaliber 18mm) von 20 cm

1) Fa. BRAUN, Melsungen

2) Fa. CENCO, Haan

3) Fa. BECKMAN Instr., München

4) Fa. AMICON, Oosterhaudt, Holland

5) Fa. KALLE, Wiesbaden

Länge abgefüllt und für 24-36h bei 4°C gegen 2l Tris-HCl-Puffer (pH 7,6 + 0,01 M EDTA + 0,02% NaN_3) dialysiert. Nach Zentrifugation für 1h bei 10.000g (4°C) wurde das Präzipitat nach immunologischer Testung auf Ferritin und negativem Ergebnis verworfen, der Überstand einer sechsständigen Dialyse gegen 2l 0,1M Natriumacetatpuffer (pH 5,4 + 0,02% NaN_3) unterzogen, worauf sich erneut eine Zentrifugation für 1h bei 10.000g (4°C) anschloß. Das Präzipitat wurde nach immunologischer Testung (s.o.) verworfen, der Überstand mit Hilfe des AMICON-Systems auf 0,1M Tris-HCl pH 7,6 + 0,01M EDTA + 0,02% NaN_3 umgepuffert und in 20 ml-Portionen bei -40°C gelagert.

Lungenkarzinom

Insgesamt standen ca. 1,5kg gepoolter Bronchialkarzinome (OP-Präparate) verschiedener Histologie (vorwiegend Plattenepithelkarzinome), welche innerhalb von drei Stunden nach Entnahme auf -40°C tiefgefroren worden waren, zur Verfügung. Nach langsamem Auftauen bis 4°C (s.o.) und sorgfältiger Präparation erfolgte, wie oben angegeben, die Zerkleinerung mit dem Messer und im Braun-Multimix, wobei pro kg Gewebe 2 l 0,9% NaCl + 1,2g NaN_3 + 15ml Trasylol Enzyminhibitor (= 300.000 KIE) zugesetzt wurden. Die abschließende feindisperse Zerkleinerung wurde mit einem Homogenisator¹⁾ nach POTTER-ELVEHJEM durchgeführt. Diese wurde in 60ml-Zylindern unter Druck- und Saugbewegungen eines motorgetriebenen (Typ 53022; bis 400 Upm), teflonbeschichteten Pistills bei 4°C vorgenommen. Nach Zusatz von weiteren 10 ml (= 200.000 KIE) Trasylol²⁾ und einer Inkubation von 2 h bei 4°C erfolgte eine Zentrifugation für 60 min bei 19.000Upm (36.000g; 4°C) mittels des "Rotor 19" in einer Beckman-Kühlzentrifuge³⁾. Das Präzipitat wurde nach negativem Ferritinnachweis (s.o.) verworfen, der Überstand mittels des AMICON-Systems (s.o.) unter Verwendung einer Ultrafiltrationsmembran PM 10 ($\varnothing$ 72 cm, Retention ca. bei MG 12.500) bei 4°C über 2-3 Tage auf ca. 1/15 des Ausgangsvolumens eingeeengt.

1) Fa. BRAUN, Melsungen

2) Fa. BAYER, Leverkusen

3) Fa. BECKMAN Instr., München

Abschließend erfolgte Umpuffern per Durchlauf von 0,1 M Tris-HCl (pH 7,6 + 0,01M EDTA + 0,02% NaN_3). Das Konzentrat wurde in 20ml-Portionen bei -40°C gelagert.

Säulenchromatographie

Gelfiltration

Zur Trennung der Gewebsextraktproteine nach ihrem Molekulargewicht (Molekularsieb-Chromatographie) wurde Sepharose 6B¹⁾, ein perlförmiges Agarose-Gel mit 60-210 μm Partikelgröße und Protein-Ausschlußgrenze von 4×10^6 (MG), verwandt. Vorbereitung und Gießen der Säule wurden nach den Empfehlungen des Herstellers (232) durchgeführt. Die Säulendimension betrug 5,0 x 85cm (A) bzw. 2,5x85cm (B), als Puffer diente 0,1M Tris-HCl, pH 7,6+0,01M EDTA + 0,02% NaN_3 . Aufgetragen wurden ca. 800mg Protein in 30-40ml Puffer (A) bzw. ca. 300 mg in 10-15ml Puffer (B). Die Elution erfolgte unter kontinuierlicher Transmissionsmessung bei 280 bzw. 254nm²⁾. Die einzelnen Fraktionen enthielten 15 (A) bzw. 5ml (B).

Die Endreinigung des isolierten Ferritins erfolgte auf einer HPLC (High Performance Liquid Chromatographie)-Anlage³⁾ durch eine HPLC Blue-Column (BC) (LKB 2135-460, Ultro Pac TSK-G 4000 SW, 7,5x600mm TP 5000) mit Vorsäule (LKB 2135-075; Ultro Pac TSK-GSW P Pre-Column, 7,5x75mm TP 5000) bei einem konstanten Druck von 6-8 bar und einer Flußrate von 0,3ml/min. Als Puffer diente 0,05MNa-Phosphat pH 7,5. Die Absorption wurde laufend bei 280nm gemessen (UVICORD S, Fa. LKB), das Eluat in 0,6ml Fraktionen gesammelt (2211 SUPERRAC, Fa. LKB).

DEAE-Anionenaustauschchromatographie (HPLC)

Bei der DEAE-Zellulose handelt es sich um eine Matrix, an die Proteine in Abhängigkeit von ihrem Ladungszustand und verwendeten Puffersystem adsorbieren und chromatographisch wieder elu-

1) Fa. PHARMACIA, Uppsala, Sweden

2) Uvicord I bzw. II, Fa. LKB, Bromma, Sweden

3) Fa. LKB, Bromma, Sweden

iert werden können. Wegen der geforderten Präzision wurde ebenfalls ein HPLC-System benutzt. Verwendung fand dabei die Säule LKB 2133-100, Ultro Pac TSK 545 DEAE, 7,5x150mm mit der Vorsäule LKB 2135-075, Ultro Pac TSK-GSW P Pre-Column, 7,5x75mm, TP 5000.

Als Puffersystem diene

- a) Natriumphosphatpuffer 0,05M, pH 7,5 (Startpuffer)
 - b) Natriumphosphatpuffer 0,05M, pH 7,5 + 0,45M NaCl, (Grenzpuffer) so daß vom schablonengesteuerten Gradientenmischer (Ultrograd, LKB) ein linearer NaCl-Gradient von 0-0,45M gefahren werden konnte. Die Flußgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min, der Druck 6-8 bar; die einzelnen Fraktionen enthielten 0,6 ml.
- Neben der Absorption (s.o.) wurde in den einzelnen Fraktionen die Ionenleitfähigkeit¹⁾ gemessen.

Affinitätschromatographie

Immunadsorption

Bei der Affinitätschromatographie mit CnBr-aktivierter Sepharose 4B²⁾ koppelt man nach Angaben des Herstellers (235) über kovalente Bindungen zwischen primären Aminogruppen und zyklischen Imidokarbonaten

- a) spezifische Antikörper oder b) hochgereinigtes Antigen an das Sepharose 4B-Gel. Durchläuft ein Gemisch, welches das entsprechende a) Antigen bzw. b) Antikörper enthält, eine derartige Säule, so wird nur das korrespondierende Protein in der Säule immunologisch gebunden. Wenn alle nichtgebundenen Substanzen eluiert sind, läßt sich unter Verwendung chaotroper Ionen (oder durch pH-Wechsel) die Antigen-Antikörperbindung lösen und das entsprechende Protein eluieren.

Pro Säule (1,7x15cm, bzw. 0,8x12cm) wurden 10g bzw. 2,5g CnBr-aktivierte Sepharose 4B als Pulver abgewogen, in 200ml 0,001 M HCl pro Gramm Gel eingerührt, 15 min. quellen gelassen und anschließend die Flüssigkeit auf einer Fritte bis auf 100ml bzw.

1) Fa. WTW, Weilheim

2) Fa. PHARMACIA, Uppsala, Schweden

30ml abgesaugt. Dieser Rest wurde zu einer Lösung von 100mg Anti-Human-Leberferritin-IgG vom Kaninchen (33) in 50ml 0,1 M Bikarbonatpuffer (0,1 M NaHCO_3 + 0,5 M NaCl, pH 8,3) bzw. 5mg saurem (pp_{2d}) oder alkalischem (pp_{2a}) Human-Plazenta-Ferritin in 25ml o.g. Puffer gegeben, das Gemisch auf 20ml-Röhrchen verteilt und über Nacht bei 4°C auf einem Horizontal-Rotator langsam überkopf gedreht und inkubiert. Danach wurden der ungebundene Antikörper bzw. das ungebundene Antigen zusammen mit der gelfreien Flüssigkeit auf einer Fritte abgesaugt. Nach zweistündiger Blockierung (R.T.) der restlichen reaktiven Gruppen mit 1M Glycinlösung, pH 8,0, und drei Waschzyklen mit 0,1 M Acetatpuffer + 1M NaCl, pH 4,0 und 0,1 M Boratpuffer + 1ml NaCl, pH 8,0 wurde das Gel in Startpuffer = Puffer VI (0,02 M Natriumphosphatpuffer + 0,9% NaCl, pH 7,3 + 0,02% NaN_3) gewaschen, entgast und in eine Säule gegossen. Zum Vorlaufen und zur Elution unspezifischer Eiweißkörper der aufgetragenen Fraktionen wurde Startpuffer (= Puffer VI) verwandt. Die Elution wurde mit einem empfindlichen Durchflußspektralphotometer¹⁾ bei 280nm verfolgt und mit einem linearen Potentiometerschreiber aufgezeichnet. Nach Elution des 1. Peaks, welcher die nichtgebundenen Proteine enthält, wurde auf den Endpuffer (= Puffer VI + 2M KSCN) umgestellt, um das gebundene Ferritin bzw. die gebundenen Ferritin-Antikörper zu eluieren. Die so gewonnenen Fraktionen des 2. Peaks wurden gepoolt, eingeengt und gleichzeitig auf Puffer VI umgepuffert.

Protein A

Beim Protein A²⁾ handelt es sich um ein Protein aus der Zellwand von Staphylokokkus aureus, welches, an Sepharose gebunden, die Isolierung von IgG aus Serum erlaubt (233). Auf die Protein A-Säule (1,5x11,5cm) wurden 12ml Serum immunisierter Kaninchen aufgetragen und mit Puffer VI (s.o.) die nichtgebundenen Serumbestandteile in Form eines 1. Peaks ausgewaschen. Anschließend wurde auf den Desorptionspuffer (100ml Puffer VI + 0,59ml Eisessig) umgestellt, um das an das Gel adsorbierte

1) Uvicord I bzw. II, Fa. LKB, Bromma, Sweden

2) Fa. PHARMACIA, Uppsala, Sweden

IgG zu eluieren. Wie o.a., wurde die Absorption bei 280nm mit einem Spektralphotometer gemessen und mit einem Potentiometerschreiber registriert.

Zentrifugation

Serumproben für die Ferritinbestimmung im RIA wurden durch zehnminütige Zentrifugation von Nativblut in einer Laborzentrifuge (Typ UJ 35)¹⁾ bei 1000g (3000 Upm) gewonnen; ebenso wurden die RIA-Teströhrchen nach Zugabe des 2. Antikörpers zentrifugiert (30 min., 1000g).

Die Zentrifugation des Plazenta- bzw. Lungenkarzinomgewebs-Homogenisats erfolgte für 60 min. bei 36000g (19000 Upm) in einer Kühl-Ultrazentrifuge²⁾ (4°C). Der eingeeengte Plazentaextrakt wurde nach jeweiliger Dialyse (siehe Gewebsextraktion) in einer Tischzentrifuge¹⁾ für 60 min. bei 10000g (15000 Upm) im Kühlraum (4°C) zentrifugiert.

Dialyse

Die Dialyse des eingeeengten Plazentaextrakts gegen Tris-HCl Puffer bzw. Acetatpuffer (siehe Gewebsextraktion) erfolgte nach Abfüllung des Dialysats in Kalle-Dialyseschläuchen³⁾ (Kaliber 18mm), welche an den Enden mit Doppelknoten zugebunden wurden. Die Dialyse erfolgte im Kühlraum (4°C) in 10-20fachem Volumen ständig durchmischten Dialysierpuffers.

Konzentrierung

Die Einengung kleiner Mengen proteinhaltiger Flüssigkeit, z.B. Fraktionen säulenchromatographischer Untersuchungen, wurde per Unterdruck mittels Kollodiumhülsen (SM 13200) aus zellulosenitrat (15x75mm)⁴⁾ in speziellen Haltevorrichtungen (SM 16311) durchgeführt. Bei einem von der Wasserstrahlpumpe erzeugten Vakuum von bis zu -500mm Hg betrug die Konzentrierzeit je nach Flüssigkeitsmenge und Proteingehalt zwischen einer und acht Stunden. Größere Mengen (über 100ml) bei chromatographischen Sammelfraktionen bzw. Gewebsextraktion wurden

1) Fa. CHRIST, Osterode

2) Fa. BECKMAN Instr., München

3) Fa. KALLE, Wiesbaden

4) Fa. SARTORIUS, Göttingen

mit dem AMICON-Ultrafiltrationssystem unter Verwendung spezieller semipermeabler Ultrafiltrationsmembranen (XM 300, Protein-Ausschlußgrenze MG 300.000; PM 10, Protein-Ausschlußgrenze MG 12.500) konzentriert. Als Einengungszellen wurden Zelltypen UF 400 und UF 200¹⁾ mit eingebautem Rührmagneten verwandt. Bei einem Filtrationsdruck (Stickstoff-Pressluft) von 5 kg/cm^2 erfolgte eine Einengung je nach Zellgröße auf 200ml bzw. 20ml. Bei großen Mengen einzuengender Flüssigkeit wurde ein Vorratsgefäß (bis 4l) vorgeschaltet. Zum Schutz vor Überkonzentrierung diente ein automatisches Endpunktüberwachungsgerät (EC 20)¹⁾.

Enteisen

Zur Entfernung der gespeicherten Eisenionen aus dem Innern der Ferritinmoleküle wurden (nach persönlicher Mitteilung von Herrn Priv.Do. J. ZÄRINGER, Medizinische Klinik I des Klinikums Großhadern, München) zehn Milliliter einer Ferritinlösung (= 1mg Ferritin) in einen kleinen Dialyseschlauch²⁾ (Kaliber 18mm) gefüllt und bei 4°C für sechs Stunden gegen einen Liter 1%ige Thioglykolsäure in 0,1 M Natriumacetatpuffer, pH 5,4 + 0,02% NaN_3 , anschließend ausgiebig für 24 Stunden gegen zwei Liter 0,02 M Natriumacetatpuffer, pH 5,4 + 0,02% NaN_3 dialysiert, wobei der Dialysepuffer alle acht Stunden erneuert wurde, und für eine Stunde bei 10.000g (15.000 Upm) zentrifugiert.

Lagerung

Da sowohl Trocknung (Lyophilisation siehe 2.1.3), als auch Einfrieren und Auftauen (siehe 2.1.3) dem rein dargestellten Ferritin (nach eigener Beobachtung besonders in höheren Konzentrationen) sehr abträglich ist, wurde es in Lösung mit Zusatz von 0,04% NaN_3 im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

1) Fa. AMICON, Oosterhout, Holland

2) Fa. KALLE, Wiesbaden

2.2.1.3 Herstellung von Antiseren

Immunisierung

Zur Immunisierung mit Ferritin-Antigen wurden Kaninchen (weiße Neuseeländer, Gewicht ca. 6kg) verwandt. Es wurden sowohl Antiseren gegen Plazenta-Gesamtferritin (pp_2) deren alkalische (pp_{2a}) und sauren (pp_{2d}) Anteile sowie die alkalischen LCESoHa) und sauren Anteile (LCESoHd) von Ferritin aus Lungenkarzinomen hergestellt.

Zur Erstimmunisierung wurden nach einem Schema von HIJMANs et al. (127) in leicht abgewandelter Form ca. 500 μ g hochgereinigtes Ferritin in 1ml physiologischer Kochsalzlösung mit 1ml komplettem Freundschens Adjuvans gemischt und s.c. in 2-4 Fußsohlen (0,2-0,3ml/Fußsohle), der Rest i.m. gespritzt. Eine Woche später wurde die gleiche Antigenmenge in inkomplettem Freundschens Adjuvans an gleicher Stelle appliziert. Drei Wochen später wurde mittels einer Serie von i.v.-Immunisierungen mit steigenden Mengen einer KAl-präzipitierten Antigenlösung folgender Herstellung geboostert:

700-1000 μ g Antigen in 2,5 ml physiologischer Kochsalzlösung
+ 1,15ml 1N Bikarbonatlösung
+ 2,5 ml 10% KAl-Sulfatlösung (tropfenweise!)

Diese Suspension wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend für 30 min. bei 1000g (= 3000 U/min) zentrifugiert. Das Präzipitat wurde nach Dekantieren in 4ml phys. Kochsalzlösung resuspendiert und in 0,5ml-Portionen eingefroren.

Diese Zubereitung wurde drei Wochen nach der letzten s.c. oder i.m. Immunisierung zweimal wöchentlich nach folgendem Schema in die Ohrvene des Kaninchens injiziert:

1. Woche: 0,05 ml; 0,1 ml; i.v.
2. Woche: 0,1 ml; 0,2 ml; i.v.
3. Woche: 0,2 ml; 0,4 ml; i.v.

Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurde den Kaninchen eine Blutprobe entnommen, welche eine Stunde bei 37°C, anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend für 15 min. bei 1000g (3000 Upm) zentrifugiert wurde. Ergab die Untersuchung des Serums mit der Immundiffusionsmethode nach OUCHTERLONY bzw. im Radioimmunoassay eine ausreichende Konzentration des spezifischen Antikörpers, wurde das Kaninchen nach Ablauf einer weiteren Woche entblutet.

Absorption und Reinigung

Auch bei fehlendem Nachweis von Antikörpern gegen Serumproteinverunreinigungen wurde das gewonnene Antiserum mit Human-Normal-Serumproteinen in einer Konzentration von 2mg/ml Antiserum absorbiert. Dieses wurde in lyophilisierter Form abgewogen und im Kaninchenserum gelöst. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37°C und über Nacht bei 4°C wurden die ausgefällten Antigen-Antikörper-Komplexe für 60min. bei 10000g (15 000 Upm) abzentrifugiert.

Die Abtrennung des IgG, welches die überwiegende Menge an spezifischem Antikörper enthielt, wurde (wie in 2.2.1.2 "Säulenchromatographie" beschrieben) mit Hilfe der Protein A-Säule durchgeführt. Die gepoolten und konzentrierten Sammelfractionen des 2. Peaks wurden nach Testung auf Aktivität des spezifischen Antikörpers in kleinen Portionen bei -40°C aufbewahrt.

Immunad/desorptionsstudien

Die durch Immunisierung mit alkalischen bzw. sauren Anteilen von Plazenta-, bzw. Lungenkarzinomferritin hergestellten und gereinigten IgG-Antikörper wurden zur Erzielung einer höheren Spezifität für alkalische bzw. saure Ferritine mittels Immunadsorption an zwei speziellen Säulen

- a) einer CnBr-aktivierten Sepharose 4B-Säule gekoppelt mit alkalischem Plazenta-Ferritin (pp_{2a})
- b) einer CnBr-aktivierten Sepharose 4B-Säule gekoppelt mit saurem Plazenta-Ferritin (pp_{2d})

weiterverarbeitet. Die jeweiligen Antikörper wurden an o.g. Säulen sowohl gleichsinnig (Antikörper gegen alkal./saure Ferr. auf Säule mit alkal./saurem Ferritin), als auch gegen-sinnig (Antikörper gegen alkal./saure Ferr. auf Säule mit saurem/alkal. Ferritin) nach der im Abschnitt "Affinitäts-chromatographie" beschriebenen Verfahrensweise z.T. mehrfach adsorbiert und eluiert. Die jeweils erhaltenen Fraktionen wurden vor weiteren Adsorptionsschritten, bzw. vor Testung im RIA nach der OUCHTERLONY- Methode auf ihre Spezifität für alkalische bzw. saure Ferritine geprüft.

2.2.1.4 Berechnungen

Für sämtliche Berechnungen (außer der Berechnungen der Ferri-tinkonzentrationen bei routinemäßiger radioimmunologischer Be-stimmung von Ferritin in Serumproben) fanden die programmier-baren Taschenrechner HEWLETT-PACKARD Hp 65 und 41 C Verwendung.

Markierung

Unter Zugrundelegung der Zählraten wurde der durch Verluste an Pipettierspitze und Reaktionsgefäß bedingte prozentuale Aktivitätsverlust bezogen auf die Gesamtaktivität und die Ver-teilung der Radioaktivität auf Protein- und Salzpeaks der er-sten Säule errechnet. Unter der Voraussetzung einer gleich-mäßigen Markierung des Proteins mit ^{125}J ließen sich über die Gesamtaktivität der Säulenfraktionen und die spezifische Aktivität die Radioaktivität und Proteinmenge der für den RIA verwandten Fraktionen der zweiten Säulen errechnen.

Antikörperverdünnungsreihe und RIA

Zur Berechnung der Antikörperverdünnungskurve wurden sämtliche im Gamma-Zähler erhaltenen Zählraten (außer Totals) um die Rate der unspezifischen Bindung (N-Wert) vermindert. Anschließend wurde für die jeweilige Verdünnungsstufe das prozentuale Ver-hältnis der gebundenen Aktivität bezogen auf die Gesamtaktivi-tät errechnet und in ein Diagramm (Ordinate: Aktivität in Pro-

zent; Abszisse: Verdünnungsstufe) eingetragen.

Zur Auswertung des RIA wurde zuerst die maximale Bindung (Nullwert) in Prozent der Gesamtaktivität errechnet. Die Zählraten der Standardproben (vermindert um den N-Wert) wurden in Prozenten des Nullwertes ermittelt und als logit auf einem speziellen Zeichenpapier (Logit-Log-Papier)

$$\text{logit } l = \ln \frac{p}{100-p}$$

$\text{logit } l = l$; p = Bindungsaktivität in Prozent;
(Ordinate: Logit l ; Abszisse: Log Ferritinkonzentrationen)
aufgetragen, wobei sich eine Gerade, d.h. eine lineare Beziehung zwischen der gebundenen Aktivität (in logit) und dem Logarithmus der entsprechenden Ferritinkonzentrationen ergibt. Mittels eines speziellen Programms (170) wurden vom Rechner nach Eingabe der logit-log-Werte der Standards der lineare Korrelationskoeffizient r , die Standardabweichung $s_{y,x}$ und die lineare Regressionsgeradengleichung mit den Geradenparametern A und B ermittelt. Die Affinitätskonstante K_a wurde nach dem SCATCHARD-PLOT-Verfahren (251) berechnet. Ein Programm im Computer des Gamma-Zählers ermöglichte weiterhin, daß nach Auszählung der Impulsraten der Analysenröhrchen unmittelbar die ermittelten Ferritinkonzentrationen ausgedruckt wurden.

Statistische Berechnungen

Für das Normal- bzw. die Patientenkollektive wurden nach eigenen Programmen auf dem Tischcomputer HP 41C folgende statistischen Untersuchungen vorgenommen. Für die Meßwerte verschiedener Kollektive wurden nach SACHS (256) arithmetisches Mittel ($\bar{x}$), Median ($\tilde{x}$), 10. und 90. Perzentil berechnet. Bei normalverteilten Kollektiven wurde der T-Test und bei nicht normalverteilten der parameterfreie U-Test nach Mann und Whitney durchgeführt.

2.2.2 Materialien und Patientengut

2.2.2.1 Material

Extrahierte Gewebe

Als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Ferritin dienten 32 Plazenten (entsprechend 12,5 kg), welche unmittelbar nach der Geburt auf -40°C tiefgefroren worden waren. Sämtliche Plazenten stammten aus der Frauenklinik des Klinikums Großhadern in München.

Außerdem wurden 16 Bronchialkarzinome (entsprechend 1,5 kg) verschiedener Histologie extrahiert: 11 Plattenepithelkarzinome

3 Kleinzellige Karzinome

2 Großzellige Karzinome

Hierbei handelte es sich ausschließlich um OP-Präparate, welche bis spätestens drei Stunden nach der Entnahme in Plastiktüten eingeschweißt und bei -40°C eingefroren worden waren. Die Präparate stammten aus der chirurgischen Abteilung und der pathologischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching.

Antiseren

Die für den RIA und die Affinitätschromatographie erforderlichen Anti-Ferritin-Seren (außer C33 = Anti-Human-Leber-Ferritin (aus Laborbeständen) waren eigene Präparationen. Zur Überprüfung der Gewebsextrakte und Säulenfraktionen auf Verunreinigungen wurden mono- und polyvalente Antiseren gegen menschliche Serumproteine (Fa. Behringwerke, Marburg) sowie Antiseren gegen Plazentaferitin und Herzferitin verwandt.

RIA-Standards

Als RIA-Standard dienten

- a) ein kommerzieller Ferritinstandard (Leber) der Firma BECTON & DICKINSON in den Konzentrationen 500; 200; 75; 25; 10; 5; 0 ng/ml,

- b) eine alkalische Fraktion (pp₂a) und
- c) eine saure Fraktion (pp₂d) von Plazentaferritin, beide aus eigener Produktion und in geometrisch abnehmenden Konzentrationen 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,2; 3,1; 1,5 ng/ml vorliegend.

2.2.2.2 Patientengut

Normalkollektiv

Als Normalkollektiv dienten 169 gesunde Bundeswehrrekruten im Alter von 18 - 22 Jahren.

Patienten mit malignen Erkrankungen

Es wurden Serumproben von 267 Patienten mit malignen Erkrankungen untersucht. Darunter befanden sich 18 Magen-, 49 Mamma-, 47 Bronchial-, 17 Pankreaskarzinompatienten sowie 18 Patientinnen mit Ovarialkarzinomen und 63 Patienten mit malignen Hodentumoren. Die einzelnen Kollektive sind jeweils als Pool verschiedener Krankheitsstadien und unterschiedlicher Tumorphysiologie anzusehen.

Patienten mit nichtmalignen Erkrankungen

Untersucht wurden die Seren von 32 Patienten mit histologisch gesicherter Leberzirrhose.

2.2.3 Eigene Ergebnisse

2.2.3.1 Methodischer Teil

Gewebe-Extraktion

Die Folge der Extraktionsschritte bis zum Konzentrat ist in Abb. 4 für Plazentagewebe und in Abb. 5 für Lungenkarzinomgewebe schematisch wiedergegeben.

Die Extraktion des Plazentagewebes gestaltete sich äußerst schwierig. Eine Homogenisation der Plazenten erfolgte nur bis zum Zerkleinern im VIRTIS Homogenizer mittels rotierender Messer, Pottern erwies sich aufgrund der Materialbeschaffenheit als unmöglich. Trotz einer 60minütigen Zentrifugation unmittelbar zuvor ging die Einengung im AMICON-System nur zögernd vonstatten, da sich in der Kälte auf der Ultrafiltrationsmembran ein geleeartiger Belag bildete und diese verstopfte. Nur durch regelmäßiges Abwaschen des Belags bzw. Auswechseln der Membran konnte dennoch eine langwierige Einengung erreicht werden.

Da eine Gelchromatographie unter diesen Umständen aussichtslos war, wurden die geleebildenden Stoffe mittels schonender Dialyse gegen Tris-HCl-Puffer sowie gegen Acetat-Puffer ausgefällt. Die Präzipitate erwiesen sich im OUCHTERLONY-Test sämtlich als Ferritin-negativ.

Die Homogenisierung des Lungenkarzinom-Gewebes konnte dagegen problemlos bis zum Pottern durchgeführt werden. Die Einengung der Extraktionsflüssigkeit verlief im Gegensatz zum Plazentaextrakt zügig und ohne Schwierigkeiten.

Reinigung des Antigens

Ab den Dialyseschritten zur Entfernung der gelierenden Stoffe aus dem Plazentaextrakt (PLES = Plazentaextrakt salin) und anschließender Konzentrierung sowohl des PLES als auch des LCES oH (= Lungencarcinomextrakt salin, ohne Hitzefällung) im Amicon-System erfolgte die Isolierung auf nachgenanntem Weg (Abb. 6): Zur gröberen Reinigung des Ferritins von Proteinen anderen Molekulargewichts wurde eine Sepharose 6B-Säule benutzt (Abb. 7 und 8). Das Eluat wurde in folgende Fraktionen unterteilt:

PLES I, II, IIIa, IIb (Abb. 7)

LCES oH I, II, IIIa, IIb (Abb. 8)

Im Ouchterlony-Test erwies sich nur jeweils die Fraktion II deutlich Ferritin-positiv (Abb. 9-11); diese wies allerdings Verunreinigungen mit anderen Proteinen wie Transferrin, Immunglobulin, Haptoglobin und Albumin, auf.

Der Probelauf einer Chromatographie der o.g. Fraktionen II auf einer Sephadex G-200 Säule erbrachte keine weitere Auflösung (ohne Bild).

Der nächste Reinigungsschritt bestand darin, die 6B II-Fractionen der Immunadsorptionschromatographie an CnBr-aktivierter Sepharose 4B (mit angekoppeltem Anti-Leberferritin-IgG C33 vom Kaninchen) zu unterziehen (Abb. 12 und 13). Die Fraktion C 33/1 enthält jeweils die nicht gebundenen Substanzen, welche mit dem Startpuffer ausgewaschen wurden, C33/3 das an die Säule gebundene und nach Pufferwechsel eluierte Ferritin. Falls in der ersten Fraktion PLES 6B II C33/1 bzw. LCES oH 6B II C33/1 noch Ferritin nachweisbar war, erfolgte eine Rechromatographie. Die Prüfung auf Reinheit des gewonnenen Ferritins im Ouchterlony-Doppeldiffusionstest zeigen die Abb. 14 und 15.

Die von der Ladung abhängige Aufspaltung in verschiedene Isoferritinfraktionen wurde mittels Anionenaustauschchromatographie auf der HPLC BC-DEAE-Säule durchgeführt. Das Isoferritinspektrum sowohl der PLES 6B II C33/3-, als auch der LCES oH C33/3-Fraktion erschien als ein langgestreckter Peak, welcher

nach steigender Ionenstärke des Elutionspuffers jeweils willkürlich in vier Fraktionen unterteilt wurde:

PLES 6B II C33/3 BC-D Ia, Ib, Ic, Id (Abb. 18 untere Kurve)

LCES oH 6B II C33/3 BC-D Ia, Ib, Ic, Id (Abb. 19 untere Kurve)

Alle Fraktionen erwiesen sich im Ouchterlony-Test als Ferritin-positiv (Abb. 16 und 17). Der Nachweis einer Auftrennung des jeweiligen pI-abhängigen Isoferritinspektrums erfolgte in der qualitativen Polyacrylamidgel-Isoelektrofokussierung (Abb. 20 und 21). Zur schärferen Abgrenzung besonders der am meisten alkalischen Fraktion Ia und der sauersten Fraktion Id sowie zur Erhöhung der Ausbeute wurden die erhaltenen Fraktionen mehrfach rechromatographiert. Nach Abschluß der Auftrennung wurde zur Qualitätskontrolle jeweils eine Mischung der Fraktionen Ia (alkal.) und Id (sauer) auf die Säule aufgetragen und chromatographiert. In den dazugehörigen Kurven (Abb. 18 und 19 jeweils obere Kurve) zeigt sich eindeutig das Fehlen der vorher maßgeblichen mittleren Fraktionen Ib und Ic sowie eine relative Anreicherung von Ia und Id.

Zur Eliminierung noch vorhandener Spuren verunreinigender Proteine und Gewinnung möglichst homogener Ferritinfraktionen (Abtrennung von Di- und Oligomeren des Ferritins) wurden sowohl die Gesamtfractionen PLES 6B II C33/3 und LCES oH 6B II C33/3 als auch deren Unterfraktionen BC-D Ia bis Id einer Endreinigung auf der hochauflösenden Gelchromatographiesäule Ultro Pac TSK G 4000 unterzogen (Abb. 22 - 25). Für die weiteren Versuche wurde jeweils nur die durch den großen Peak gekennzeichnete Fraktion III verwendet, deren Rechromatographie einen schmalen, hohen Peak ergab, welcher bei immunologischer Prüfung (Immunodiffusion) eine starke und scharf abgegrenzte Präzipitationslinie mit A-pp₂-Serum bildete, sich jedoch in Bezug auf Anti-Humanserum negativ erwies (Abb. 26). Das enteisente Ferritin PLES 6B II C33/3 "enteisent" ergab in der gleichen Auftrennung ein im Vergleich zum nativen Ferritin stark verändertes Profil ohne eindeutige Abgrenzung der einzelnen Peaks, wobei die einzelnen Fraktionen II, III, vor allem aber IV sich im Ouchterlony-Test als Ferritin-positiv erwiesen (Abb. 27).

Herstellung von Antiseren

Insgesamt wurden fünf Kaninchen mit den in Tabelle 10 aufgeführten Ferritinfraktionen immunisiert. Eine Woche nach Beendigung der Immunisierung wurde eine Blutprobe entnommen und das Serum im Ouchterlony-Test untersucht. Antiserum 50 wies eine deutliche, 48, 49, 51 und 52, eine sehr starke Präzipitationslinie gegen Plazentagesamtferritin pp_2 bzw. ferritinhaltige Fraktionen auf. Die Kaninchen wurden daraufhin entblutet, wobei Serummengen zwischen 44 und 64ml pro Kaninchen gewonnen wurden. Die Ergebnisse der Testung in der Ouchterlony-Doppeldiffusion zeigen Abb. 28-30, woraus hervorgeht, daß die Antiseren nur noch gegen Ferritin, bzw. ferritinhaltige Fraktionen, nicht jedoch gegen Humanserum Präzipitationslinien bildeten.

Die reine IgG-Lösung der Antiseren wurde durch Chromatographie auf einer Protein A-Säule gewonnen. Ein typisches Chromatogramm zeigt Abb. 31.

Immunad/desorptionsstudien

Obwohl mit eindeutig sauren bzw. alkalischen Ferritinanteilen immunisiert worden war, wiesen die nativen Antiseren in der immunologischen Testung gegen Plazentagesamtferritin pp_2 , bzw. saure und alkalische Ferritinfraktionen keine eindeutigen Unterschiede auf (Abb. 29 und 30).

Zur Erzielung einer höheren Spezifität der Antiseren wurde versucht, durch wechselweise Ad/Desorption an CnBr-aktivierter Sepharose 4B, welche mit sauren (Säule cpp_2 Id) bzw. alkalischen (Säule cpp_2 Ia) Plazentaferritinen gekoppelt war, im Idealfall eine Auftrennung des IgG in solche Antikörper, die nur gegen die antigenen Determinanten der sauren Ferritine und solche, welche nur gegen diejenigen der alkalischen Ferritine gerichtet sind, zu erreichen. Im Rahmen dieses Vorhabens erfolgten Ad/Desorptionsstudien der Antiseren Nr. 49 (A-alkal. Plazentaferritin) 50 (A-saures Plazentaferritin) und 52 (A-saures Lungen-Ca-Ferritin). Die wichtigsten Ad/Desorptionsschritte sind in der Abb. 32 -34 und die wichtigsten Chromatogramme in den

Abb. 35 -41 dargestellt. Die Prüfung der nach jeweils verschiedenen Ad/Desorptionsschritten gewonnenen Antikörperfraktionen gegen die sauren und alkalischen Anteile des Plazentaferritins und des Lungen-Ca-Ferritins sowie gegen Plazenta-Gesamtferritin erbrachte keinen eindeutigen Beweis für eine Spezifizierung der untersuchten Antiseren 49, 50 und 52 (Abb. 42 - 53), sondern lediglich Anhaltspunkte für eine Bevorzugung des alkalischen Anteils LCES oH 6B II C33/3 BC-D Ia durch den Antikörper 50 PA/3 $\text{cpp}_2\text{Ia}/3$, welcher mittels Adsorption an alkalisches Ferritin (Cpp_2Ia) aus dem primär mit saurem Plazentaferritin hergestellten Antiserum 50 PA/3 gewonnen wurde, sichtbar an einer Spornbildung gegenüber 50 PA/3 $\text{cpp}_2\text{Ia}/1$ (Abb. 54). Nach vielfacher Absorption jedoch entzogen sich die einzelnen Fraktionen durch zu starke Ausdünnung der Nachweisbarkeit der Ouchterlony-Doppeldiffusion.

Hinweise auf eine mögliche Differenzierung von saurem und alkalischem Ferritin ergab allerdings die Testung des gegen Ferritin aus menschlichem Herz gerichteten Antiserums A-HHF HT 10 (Dr. M. WORWOOD, University of Wales, Cardiff). Auf der Agarplatte ergab sich eine deutliche Spornbildung in der Reaktion des A-HHF mit LCES oH 6B II C33/3 BC-DId (sauer) gegenüber BC-DIa (alkal.) (Abb. 55 und 56). Interessanterweise zeigte sich jedoch keine Spornbildung in der Reaktion von A-HHF mit LCES oH 6B II C33/3 BC-D III (= Saure Anteile enthaltende Fraktion des Lungen-Ca-Ferritins), gegenüber Leberferritin NLIVES C33/3 sowie mit PLES 6B II C33/3 BC-D Id (= $\text{pp}_2\text{BC-d}$) gegenüber Ia, bzw. mit LCES oH 6B II C33/3 BC-D d gegenüber $\text{pp}_2\text{BC-d}$ (Abb. 56).

Radioimmunoassay

Markierung und Reinigung des markierten Proteins

Chloramin T-Methode

Bei einer Markierung wurden jeweils 5 μg Ferritin mit 0,3 mCi ^{125}J zur Reaktion gebracht. Bei der Reinigung auf Sephadex G 50 fine (Abb. 57A) wurde zuerst ein mäßiger, steiler Proteinpeak, dann ein vierfach höherer, ebenfalls steiler Salzpeak eluiert.

Im Proteinpeak fand sich nur ein geringer Teil der Radioaktivität, im angeführten Beispiel 10,5%. Die Fraktionen mit der stärksten Aktivität - in der Abb. schraffiert - wurden gepoolt und auf Sepharose 6B rechromatographiert. Das Chromatogramm (Abb. 57B) ergab einen einzigen, sehr breiten Peak, der keine weitere eindeutige Abgrenzung erkennen ließ. Die Fraktionen mit der größten Radioaktivität wurden gepoolt und auf ihre Verwendbarkeit im RIA geprüft. Im vorliegenden Fall enthielt das auf die Sephadex G 50 fine-Säule aufgetragene Gemisch 5 µg einer mittleren Fraktion (BC-DEAE Ib) Plazentaferitin mit einer spezifischen Aktivität von 6,3 µCi/µg Protein.

Methode nach BOLTON und HUNTER

Bei dieser Markierung wurden 10µg Protein eingesetzt. Bei der Reinigung auf HPLC Ultropac TSK G 4000 SWG (Abb. 58) wurde zuerst ein sowohl in der Aktivitäts- als auch in der Absorptionskurve bei 280 nm steiler Peak eluiert, welcher im vorliegenden Fall einen Anteil von 15,7% der Radioaktivität (spezif. Aktivität = 17,3 µCi/µg) enthielt. Später erschien, vom ersten Peak scharf abgegrenzt, ein weiterer steiler Ausschlag in der Aktivitäts-, nicht aber der Absorptionskurve, was durch das nicht konjugierte ¹²⁵J-BOLTON-HUNTER-Reagenz bedingt ist. Die Fraktion, welche den ersten Peak enthielt, wurde auf ihre Verwendbarkeit im RIA geprüft. Im angeführten Beispiel enthielt das auf die HPLC-Säule aufgetragene Reaktionsgemisch 10 µg einer mäßig sauren Fraktion von Lungenkarzinomferitin mit einer spezifischen Aktivität von 17,3 µCi/µg Protein.

Antikörperverdünnungskurve

Abb. 59 zeigt die Antikörperverdünnungskurven für die folgenden Antikörperfraktionen: Nr. 49 II (= 49 PA/3-a/3-11xd/1), 50 II (= 50 PA/3-d/3-2xa/1), 50 PA/3-d/3-a/3, 52 PA/3, 52 PA/3-d/3-a/3, 51 PA/3 und zum Vergleich ein laboreigenes Anti-Leberferitin-Serum Nr. 33. Die beste Vergleichsmöglichkeit bot sich bei einer Bindung von 50%, jeweils im steilsten Abfall der Kurven. Die Verdünnung der Antiseren errechnet sich dabei aus o.g. Abbildung durch Multiplikation des reziproken Antikörperwertes mit dem Faktor f, wobei die Titerstärke zwischen 1:51 und 1:586667 schwankte.

Aus der Abbildung kann für die getesteten Antikörperfraktionen folgendes abgeleitet werden:

1. Alle Antiseren mit Ausnahme von 50 II wiesen fast übereinstimmend eine maximale Bindung des Tracers von ca. 85% auf. Bei 50 II betrug sie knapp 80%.
2. Alle Bindungskurven verliefen annähernd parallel, was für ein ähnliches Bindungsverhalten der verschiedenen Antiseren in Bezug auf den Tracer spricht.
3. Die hochtitrigsten Antiseren waren Nr. 51 PA/3 (1:586667) und 50 PA/3-d/3-a/3 (1:565333); in absteigender Reihenfolge kamen Nr. 33 (1:72533), 52 PA/3-d/3-a/3 (1:62933), 52 PA/3 (1:20267), 49 II (1:14670) und 50 II (1:51). Für den RIA wurde für die einzelnen Antiseren eine Bindung von 35-40% ausgewählt.

Standardkurve

In Ermangelung eines internationalen Referenzstandards benutzen wir zur Eichung einen kommerziellen Ferritinstandard (Leber) der Fa. BECTON & DICKINSON in einem Bereich zwischen 5 und 500ng/ml sowie jeweils eine alkalische (a) und eine saure (d) Fraktion von Plazentaferritin eigener Präparation in einem Bereich zwischen 1,1 und 200 ng/ml. Als 1. Antikörper wurde ein eigenes Anti-Ferritin-Serum in geeigneter Verdünnung eingesetzt.

Die wichtigsten Standardkurven zeigen die Abb. 60-64. Nach dem Logit-Log-Auswerteverfahren resultierten bei allen Testansätzen durchgehende Geraden. Außerdem waren die Geraden sowohl für die verschiedenen Antiseren als auch unter Verwendung der verschiedenen Standards nahezu identisch bzw. wiesen nur geringfügige Schwankungen auf. Als wichtigstes Merkmal ist jedoch die Überwiegende Parallelität der Geraden hervorzuheben. Daraus ist abzuleiten, daß mit sämtlichen getesteten Antiseren kein wesentlicher Unterschied im Bindungsverhalten zu den verschiedenen Standards zu entdecken war. In Tabelle 11 sind die Parameter der Geradengleichungen nach Logit-Log-Auswertung von Standardgeraden und Kontrollserum-Werten eines Ferritin-Radioimmunoassays

unter Verwendung eines einheitlichen Ferritin-Tracers (Lungenkarzinom-Ferritin) und verschiedenen Anti-Ferritin-Antisera zusammengestellt. Dabei wurden zwei Antisera gegen alkalische Isoferritin-Anteile von Plazenta- (Nr. 49) bzw. Lungenkarzinomferritin (Nr. 51) bzw. deren sauren Isoferritinanteile (Nr. 50 bzw. Nr. 52) im Vergleich zu einem Antiserum gegen Gesamt-Leberferritin (Nr. 33) miteinander verglichen. Unter Verwendung unterschiedlicher Antiserum-Verdünnungen ($1/25000$ - $1/700000$) lagen die für den jeweiligen RIA verwendeten Bindungsaktivitäten des Null-Standards zwischen 31,9 und 54,8% bei einer unspezifischen Bindung von 0,8%. Entsprechend der Verschiebung der Standardgeraden lagen die 50%-Punkt-Werte meist zwischen 20 und 35 ng/ml, für Antiserum Nr. 49 jedoch zwischen 60 und 80 ng/ml. Die unter Verwendung von 4-7 Standardpunkten berechneten Logit-Log-Geradengleichungen wiesen alle lineare Korrelationskoeffizienten von $r = -0,997$ und kleiner auf. Ein Vergleich der unter Verwendung der verschiedenen Standards (Gesamt-Leberferritin BECTON & DICKINSON, alkalisches Plazenta-Ferr. = a, saures Plazenta-Ferritin = d) und Antisera erhaltenen y-Achsenabschnitte (A-Werte) ergibt (siehe Tab. 11), daß der Mittelwert von A bei Antiserum Nr. 49 signifikant höher liegt als alle anderen A-Werte ($p < 0,01$ gegenüber Nr. 51 bis $p < 0,002$ bei Nr. 33). Ferner ist der gemittelte A-Wert von Nr. 51 noch von dem von Nr. 33 unterschieden ($p < 0,02$). Ein Vergleich der Steigungswerte B ergibt lediglich einen signifikant niedrigeren Mittelwert von Nr. 33 gegenüber den gemittelten B-Werten von Nr. 50, 51, und 52 ($p < 0,01$ - $< 0,05$). Ein Vergleich der Standardgeraden für die verschiedenen Standards unter Verwendung eines einheitlichen Antisera zeigt, daß die Streuungen der B-Werte meist nur zwischen 1,4% und 3,0% (Var.Koeff.) und nur für Nr. 49 bei 5,7% liegt, d.h. daß die Standardgeraden für einen Antikörper unter Verwendung verschiedener Standards praktisch parallel verlaufen, was das wesentliche Kriterium für die Übereinstimmung der meisten erfaßten Antigen-Determinanten eines Standards darstellt. Ferner sind bei Verwendung der verschiedenen Antisera auch die meisten Standardgeraden wiederum parallel bis auf

signifikante Unterschiede zur Steigung von Nr. 33. Bei den A-Werten liegen die Streuungen zwischen 5,1% und 7,1% für die einzelnen Antiseren, d.h. etwas höher als bei den B-Werten. Dieser Parameter spielt jedoch für die Beurteilung der Spezifität eines bestimmten Standards oder Antiserums nur eine untergeordnete Bedeutung. In den letzten vier Spalten der Tab. 11 sind die mit den einzelnen Standardgeraden ermittelten Kontrollserumwerte für vier verschiedenen Kontrollen aufgetragen, von denen drei (K1, K3, K4) im Bereich zwischen 30 und 40 ng/ml und K2 im Bereich zwischen 130 und 160 ng/ml liegen. Hierbei fällt im allgemeinen auf, daß Standard B&D und PP2d in der Regel ähnliche und leicht höhere Werte liefern als Standard PP2a. Die gemittelten Werte für ein Antiserum (Tab. 12) weisen im Vergleich zu den A- und B-Werten deutlich höhere Streuungen (Variationskoeffizienten) übereinstimmend im Bereich zwischen 10 und 20% auf. Eine statistische Auswertung der für die verschiedenen Antiseren erhaltenen gemittelten Kontrollserumwerte ergibt keinen statistisch zu sichernden Unterschied. In der Tab. 12 (unterer Teil) sind auch die statistisch interessanten Parameter für die gemittelten Werte A und B sowie Kontrollserumwerte K1 bis K4 für die verschiedenen Standardgeraden nach Aufgliederung für die drei verwendeten Standards (BRD; pp2a, pp2d) ohne Berücksichtigung der verschiedenen Antiseren zusammengestellt. Nach dieser Zusammenstellung verdoppeln sich die Variationskoeffizienten für die A-Werte (12-16%), liegen jedoch für die B-Werte nur leicht höher (2-4,1%), während sie für die verschiedenen Kontrollseren deutlich niedriger liegen (8-15%, meist um 10%). Ein statistischer Vergleich dieser Mittelwerte ergibt hier keinen signifikanten Unterschied zwischen den gemittelten A- und B-Werten. Für die Kontrollseren läßt sich nunmehr die schon aus Tab. 11 zu beobachtende Differenz zwischen den niedrigeren Werten von Standard PP2a gegenüber den anderen beiden statistisch sichern: die Mittelwerte der Kontrollseren für Standard B&D und PP2d zeigen keine signifikanten Unterschiede, beide jedoch einen signifikanten Unterschied zu den niedrigeren Werten von Standard PP2a (p zwischen $<0,01$ und $<0,001$).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß durch Verwendung der verschiedenen Antiseren und Standards keine statistisch zu sichernden Unterschiede in den Steigungen der Standardgeraden gefunden wurden, d.h. aber, daß mit den hier verwandten Trennmethode, Immunisierungs- und Absorptionsmethoden neben den möglicherweise erfaßten Antigendeterminanten für saure bzw. alkalische Isoferritine der überwiegende Anteil der Antigendeterminanten trotz unterschiedlicher Immunabsorptionen mit den verschiedenen Antiseren übereinstimmend erfaßt wird. Bezüglich der Kontrollserumwerte lagen insgesamt die mit dem Standard PP2a (basische Isoferritine) erhaltenen Werte signifikant unter denen der Standards PP2d (saure Isoferritine) und B&D (Gesamt-Leberferritin). Dieser Unterschied zeigt sich bei allen Kontrollseren, von denen ein Teil von Tumorseren als auch von Patienten mit benignen z.B. Lebererkrankungen stammte. Der Unterschied ist deswegen nicht für irgendein Isoferritin spezifisch, sondern ist lediglich durch eine zu hohe Kalibrierung des Standards pp2a bedingt.

In Abb. 65 ist eine SCATCHARD-PLOT-Untersuchung des für den Radioimmunoassay verwandten Antiserum Nr. 52 d/3-a/3 (Anti-Ferritin-IgG gegen saure und alkalische Lungenkarzinomferritin-anteile) wiedergegeben. Für diese Untersuchung wurden Standardpunkte der Standardgeraden von 5 RIA-Testen (Nr. 5,12,13,16, 17) einbezogen. Die für 26 Punkte ermittelte Regressionsgleichung wies einen linearen Korrelationskoeffizienten von $r=-0,997$ und eine Streuung von $s_{y \cdot x}=0,016$ auf. Die für Antiserum Nr.52 ermittelte Affinitätskonstante ergab einen hohen apparenten Wert von $K_a=10,94 \times 10^{10}$ l/Mol und eine apparente Konzentration von $C_a = 5,87 \times 10^{-12}$ Mol/l.

In den Tabellen 13 und 14 sind Mittelwerte, Streuungen (Standardabweichungen) und Variationskoeffizienten der Standard-Bindungsaktivitäten und der wichtigsten Parameter der Logit-Log. Auswertungen von 19 Ferritin-RIA-Testen unter Verwendung von Antiserum Nr. 52 und des Standards B&D (Gesamt-Leberferritin) zusammengestellt. Eine graphische Darstellung von Tab. 13 ist in Abb. 66 wiedergegeben, wobei eine gemittelte Regressionsgerade für die verwandten 107 Standardpunkte eingezeichnet wurde. Wie aus der Abb. 66 und Tab. 13 ersichtlich, wurden in der Logit-Log-Auswertung lineare Standardgeraden über einen Konzentrationsbereich von 5 bis 500 ng/ml erhalten. Für die 19 Tests nahmen die Streuungen der Standards vom niedrigeren Konzentrationsbereich (zwischen 2 und 5% VK) zu den hohen Konzentrationen (20-25%) deutlich zu. Nach Tab. 14 lagen die Bindungsaktivitäten der Null-Standards im Mittel bei 39,6% und der Ferritingehalt für die 50%-Punkte im Mittel bei 44,2 ng/ml. Für die Kenngrößen der Logit-Log-Gleichungen lagen die A-Werte im Mittel bei 3,99 und die B-Werte (Steigungen) im Mittel bei -2,44 bei nur geringen Streuungen um 5% VK; der gemittelte B-Wert kommt dem aus theoretischen Gründen optimalen Steigungswert von -2,3 sehr nahe. Schließlich sind in den letzten drei Kolumnen der Tab. 14 noch die gemittelten Kontrollserumwerte für 3 Kontrollen im Bereich von 30, 60 und 120 ng/ml angegeben. Die dabei gefundenen geringen Streuungen weisen eine ausgezeichnete Inter-Assay-Variation des etablierten Ferritin-RIA zwischen 8,4% und 10,7% auf; die bei Mehrfachbestimmungen in einem Test gefundene Inter-Assay-Varia-

Haltbarkeit

Pro Markierung wurden ca. 100-150 ml Tracer entsprechend 500-750 Doppelbestimmungen gewonnen und in 10 ml-Portionen bei 4°C gelagert. Das markierte Ferritin wurde in einer Zeit von vier bis sechs Wochen verbraucht, wobei kein Hinweis für eine wesentliche Verminderung der Immunreaktivität oder der Spezifität gefunden werden konnte. Die Abnahme der Radioaktivität konnte durch eine Verlängerung der Zählzeit ausgeglichen werden.

2.3.3.2 Serumferritin-Bestimmung bei Normal- und Patientenkollektiven

Die Werte für die einzelnen Kollektive gehen aus Tabelle 15 hervor. Bei 169 gesunden jungen Männern befand sich das Serumferritin in einem Bereich zwischen 25,7 und 142,3 ng/ml. Mittelwert und Median betrugen $70,3 \pm 29,4$ ng/ml bzw. 66,1 ng/ml bei einem 10. Perzentil von 32,5 ng/ml und einem 90. Perzentil von 113,9 ng/ml.

Gestützt auf o.g. Ergebnisse legten wir die obere Normgrenze bei Verwendung unseres eigenen Assays auf 150 ng/ml fest. Diese wurde von den Patientenkollektiven in folgendem Ausmaß überschritten (Sensitivität):

Magen-Ca	22,2 %
Colon-Ca	30,9 %
Mamma-Ca	40,8 %
Ovarial-Ca	44,4 %
mal. Hodentum.	44,4 %
Leberzirrhose	53,1 %
Bronchial-Ca	61,7 %
Pankreas-Ca	76,5 %

35,5 % der Fälle von Pankreas-Ca wiesen exzessiv erhöhte Serumferritinspiegel von über 1000 ng/ml auf.

Da aufgrund fehlender Normalverteilung eine Signifikanzprüfung im T-Test nicht möglich war, erfolgte deren Berechnung mittels des U-Tests nach MANN und WHITNEY, in dessen Rahmen die einzelnen Kollektive gegenseitig auf Signifikanz geprüft wurden. In Tabelle 15 sind die einzelnen Kollektive nach ihrem jeweiligen Signifikanzgrad geordnet. Daraus geht hervor, daß sich alle Patientenkollektive mit Ausnahme des Magenkarzinoms (in unterschiedlichem Grad) signifikant vom Normalkollektiv unterschieden. Am signifikantesten unterschied sich das Pankreaskarzinom von allen anderen Kollektiven.

2.2.4 Diskussion

2.2.4.1 Methodischer Teil

Gewebe-Extraktion und Reinigung des Antigens

Von den meisten Autoren wurden alkalische Ferritine aus Leber und Milz, die sauren Ferritine aus Herz, seltener aus HeLa-Zellkulturen gewonnen.

In der vorliegenden Arbeit wurden, um erstmals einen Vergleich zwischen alkalischen und sauren Isoferritinen unter Ausschluß jeglicher Organspezifität anstellen zu können, alkalische und saure Ferritine aus einem einzigen Organ gewonnen, nämlich aus reifen Plazenten. Die Tauglichkeit nicht nur von Plazenten der frühen (83) und mittleren Schwangerschaft (175), sondern auch der reifen Plazenta als Lieferant eines großen Spektrums an Isoferritinen wurde auch von KONIJN et al. in einer Veröffentlichung (166) bestätigt. Als Quelle für alkalische und saure "Tumor-Ferritine" dienten Bronchialkarzinome.

Nach dem Zerkleinern und Homogenisieren (mit NaCl-Lsg. versetzt) der Plazenten wurde der Gewebepulver, wie von den meisten Autoren (4, 9, 80, 96, 166, 184, 219, 225) verfahren, einer Hitzegefällung (10 min.; 70-75°C) unterzogen, um den Anteil der hitzeempfindlichen Proteine zu vermindern. Nach dem Abzentrifugieren der denaturierten Stoffe erfolgte unter der Vorstellung, daß nur Proteine mit einem Molekulargewicht ab 300.000 (Apo ferritin 450.000) zurückgehalten würden, die Einengung des ferritinhaltigen Extrakts durch eine XM-300 Membran (Fa. AMICON). Ein ursprünglich beabsichtigtes "Durchwaschen" des Konzentrats mit mehreren Litern Puffer zur Entfernung von Proteinen geringeren MGs - wie von PAGÉ (225) bei der Extraktion von Leberferritin empfohlen - war nicht möglich, da sich die Einengung trotz vorheriger Ultrazentrifugation bei 36.000g infolge eines geleeartigen, festhaftenden Belags, welcher sich bevorzugt in der Kälte (4°C) auf der Ultrafiltrationsmembran bildete, langwierig hinzog und gelegentlich sistierte. Die Identität der für diesen Um-

stand verantwortlichen Faktoren konnte jedoch nicht ermittelt werden; möglicherweise handelte es sich hierbei um in der Plazenta in hoher Konzentration enthaltene Gerinnungsfaktoren, um Immunglobuline (Kälteagglutinine?) oder durch die Hitzebehandlung veränderte Proteine oder kollagene Substanzen. Bemerkenswerterweise war über dieses Phänomen von anderen Autoren nie berichtet worden. Aufgrund eigener Beobachtungen erwies sich zur Ausfällung dieser Störstoffe, welche jede Art von nachfolgender Säulenchromatographie unmöglich zu machen schienen, eine Dialyse des Konzentrats gegen 0,1m Tris-Puffer und anschließend gegen 0,1m Acetatpuffer mit jeweils nachfolgender Zentrifugation als geeignet. Eine Veränderung des Ferritins war bei dieser Prozedur nicht zu befürchten, da die o.g. Puffer bei der Extraktion bzw. Säulenchromatographie allgemein üblich sind.

Während Ferritin bisher als ein äußerst hitzeresistentes Protein galt, welches eine Temperatur von 80°C über 10 min unbeschadet übersteht (88, 255, 289), wird dies von FRENKEL et al. (96) bezweifelt: In einer - allerdings erst nach Beginn vorliegender Arbeit erschienenen - Veröffentlichung beschrieben diese Autoren eine infolge Hitzebehandlung mit einer Änderung der Aminosäurezusammensetzung einhergehende Veränderung der immunologischen Eigenschaften von Ferritin, besonders jedoch der an H-Untereinheiten reichen Anteile (d.h. der sauren Ferritine). Aufgrund dieses Berichts wurde bei der später erfolgten Extraktion von Lungenkarzinomen auf die Anwendung der Hitzefällung verzichtet (oH). Zur Hemmung proteolytischer Enzyme wurden insgesamt 500.000 KIE Trasylol (= Aprotinin) zugegeben. Im Gegensatz zu der von FRENKEL et al. (96) alternativ empfohlenen Extraktionsmethode wurde bei der Extraktion von Lungenkarzinomen, obwohl keine Berichte über eine Schädigung des Ferritins durch die Gegenwart von Ammoniumsulfat vorlagen, auf die Fällung des Ferritins mit 60% Ammoniumsulfat verzichtet, um durch Auslassung sämtlicher Fällungsschritte von möglichst unverändertem Ferritin ausgehen zu können.

Bei der weiteren Verarbeitung der Gewebsextrakte wurde zur Reindarstellung des Ferritins von den einzelnen Arbeitsgruppen eine Vielzahl von Methoden, welche bereits ausführlich in "2.1.9 Isolierung aus Gewebe bzw. Serum" dargestellt wurden, angewandt. Dabei wurden meist mehrere dieser Methoden kombiniert: GRANICK (105), ein Pionier der Ferritinforschung, gewann angeblich reines Ferritin durch Kristallisation mittels Cadmiumsulfat aus einer Lösung des Präzipitats nach Ammoniumsulfatfällung; allerdings stellte sich dabei heraus, daß sich nicht alles Ferritin durch CdSO_4 fällen ließ. Außerdem beobachtete DRYSDALE (123), daß sich CdSO_4 -kristallisiertes Leberferritin in der IEF von nichtkristallisiertem Ferritin unterschied. Aus diesen Gründen schied die CdSO_4 -Fällung für unsere Präparationsmethode, bei der es sowohl um eine möglichst vollständige Erfassung als auch um die Gewinnung möglichst unveränderten Ferritins ging, aus. PENDERS et al. (229) führte mit dem nach Hitzefällung erhaltenen Überstand eine Ultrazentrifugation (78.000g, 1h) durch, löste das Präzipitat und schloß daran eine zweimalige Ultrazentrifugation von 95.000g für eine Stunde an, wobei das Ferritin sedimentierte. Diese Methode erfährt insofern eine Einschränkung, als JONES (146) zufolge die sauren und gleichzeitig stark eisenhaltigen Ferritine eher präzipitieren. Der in vorliegender Arbeit verwendeten Methode kommt das Vorgehen von LAVOIE et al. (175), bei dem sich an die Homogenisation von Plazentagewebe und anschließende Zentrifugation eine Immunaффinitätschromatographie des Überstandes mit nachfolgender Endreinigung durch eine Sepharose 6B-Gelchromatographie anschließt, näher. Nach LAMERZ et al. (171) wurde das gelöste Lyophilisat des Überstandes einer salinen Lungentumorextraktion zuerst auf eine Sepharose 6B-Säule aufgetragen und die ferritinreiche Fraktion dann erst durch eine CNBr-aktivierte Sepharose 4B-Säule mit angekoppeltem Ferritin-Antikörper geschickt, was im Gegensatz zur Verfahrensweise von LAVOIE et al. (175) zweckmäßiger erscheint, da hier das enthaltene Ferritin dem an die Säule gekoppelten Antikörper in größerer Konzentration angeboten werden kann. Allerdings wurde in vorliegender Arbeit im Gegensatz zu LAMERZ et al. (171) auf jegliche Lyophilisation irgendwelcher Fraktionen verzichtet, da in der Literatur Strukturänderungen des Ferritins auch nach Trocknung und Rehy-

dratation beschrieben worden sind (195, 197). Während die Gelchromatographie auf Sepharose 6B eine wertvolle Methode darstellte, erwies sich die anschließende Chromatographie auf Sephadex G 200, wie von JONES et al. (147) beschrieben, sowohl beim PLES, als auch beim LCES oH, als überflüssig. Zur quantitativen Auftrennung des Ferritinspektrums eines Organs in Gruppen von Isoferritinen wurden von anderen Untersuchern die Anionenaustauschchromatographie (14, 166, 190) und Chromatofokussierung (42, 94) angewandt. Während ASAKAWA und MORI (14) die an DEAE absorbierten Ferritine diskontinuierlich mit Acetatpuffer pH 5,5 - 5,0 - 4,5 eluierten, benutzten KONIJN et al. (166) Phosphatpuffer mit steigender NaCl-Konzentration. Bei vorliegender Arbeit fand wegen ihres hohen Auflösungsvermögens die HPLC-Säule UltroPac TSK 545 DEAE Verwendung, wobei mit steigendem NaCl-Gradienten (0 - 0,45M) und somit steigender Ionenstärke des Puffers (0,05M Na-Phosphat pH 7,5) zuerst die alkalischen und dann die sauren Anteile eluiert werden konnten. Der HPLC-Ionenaustauschchromatographie wurde im Gegensatz zu der zur Auftrennung der Ferritine ebenfalls in Frage kommenden präparativen Isoelektrofokussierung in sog. granuliertem Gel wegen praktisch vernachlässigbar geringer Substanzverluste und daher beliebig häufiger Wiederholbarkeit der Auftrennung, bzw. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, der Vorzug gegeben. Die Auftrennung der Ferritine brachte zwar keine einzelnen Banden von Isoferritinen zutage, ergab aber Fraktionen alkalischen, mittleren und sauren Ferritins, was durch analytische PAG-Isoelektrofokussierung und, nach mehrfacher Rechromatographie zur besseren Abgrenzung der sauersten und alkalischsten Ferritinfraktionen, durch jeweils einen Chromatographie-Lauf für Plazenta- und für Lungenkarzinomferritin verifiziert werden konnte. Bemerkenswert erschien die Tatsache, daß die nach dem Kriterium der Ionenstärke eluierten Ferritinfraktionen eine Verteilung entsprechend ihres pI aufzuweisen schienen.

Die Endreinigung des gewonnenen Ferritins, bzw. dessen Isoferritinfraktionen erfolgte mittels hochauflösender Gelchromatographie HPLC UltroPac TSK G 4000 SW, wobei vermutlich vorwiegend

Di- und Oligomere des Ferritins abgetrennt wurden. Die Größe der Peaks I und II stieg sowohl beim Plazenta- als auch beim Lungenkarzinomferritin mit zunehmender Acidität der jeweils chromatographierten Fraktionen an, was übereinstimmt mit der Beobachtung von KONIJN et al. (166), wonach die Tendenz zur Bildung von Di-, Tri-, und Oligomeren mit steigender Acidität der Ferritine zunimmt; danach sollen die alkalischen Plazentaferritine 98,5% Monomere und nur 1,5% Dimere, die sauersten aber nur 51,5% Monomere, jedoch 48,5% Di-, Tri- und Oligomere enthalten (166).

Die Auftrennung des enteisenen Ferritins nach dem Kriterium des Molekulargewichts in der HPLC-Gelchromatographie zeigt eine gegenüber dem nativen Ferritin erheblich veränderte Verteilung mit schlecht voneinander abgrenzbaren Peaks im Chromatogramm, so daß trotz der von VAN OOST und WILLEKENS (219) sowie von PORTER (239) beobachteten Steigerung der Immunreaktivität nach dem Enteisen des Ferritins das Risiko einer etwaigen qualitativen immunologischen Veränderung nicht eingegangen und somit das enteisenste Ferritin für die folgenden Versuche nicht weiterverwandt wurde.

Herstellung der Antiseren

Wie bereits in "2.1.4 Isoferritine und ihre immunologische Heterogenität" berichtet, wurde zur Herstellung von Antiseren gegen saure Ferritine von manchen Autoren das Meerschweinchen (13, 147, 191) bzw. das Schaf (191) bevorzugt; nach MARCUS et al. (191) bilden Kaninchen angeblich nur Antikörper gegen die alkalischen Komponenten des Ferritins. JONES und WORWOOD (146) berichteten jedoch auch über ein in Kaninchen hergestelltes Antiserum gegen saures Herz-Ferritin. Aufgrund dieser Tatsache sowie wegen der leichteren Tierhaltung und der im Vergleich zum Meerschweinchen größeren Ausbeute an Antiserum wurden für die vorliegende Arbeit als Antikörperproduzent Kaninchen gewählt.

In Tabelle 16 sind die Immunisierungsverfahren verschiedener Untersucher zusammengestellt. Von MARCUS und ZINBERG (189) sowie von LAMERZ et al. (171) wurden zur Immunisierung ungereinigte

Tumorextrakte verwandt; die übrigen Autoren benutzten gereinigte Ferritinpräparationen in Mengen von wenigen μg bis mg . Als Erstimmunisierung wurden i.c. (99), s.c. (73, 147, 171, 189, 283), i.m. (46, 113, 146, 244), i.p. (12) bzw. i.v. (53) Injektionen mit komplettem Freundschens Adjuvans bevorzugt, zur Auffrischungsimpfung wurden wiederholte Injektionen mit komplettem Freundschens Adjuvans (146), inkomplettem Freundschens Adjuvans (12, 73, 147, 171, 244, 283) bzw. ohne Freundschens Adjuvans (53, 111, 113) verwendet. Das in vorliegender Arbeit praktizierte, an die Methode von HIJMANS et al. (127) angelehnte Immunisierungsschema lieferte in der verhältnismäßig kurzen Zeit von acht Wochen bei mittleren Antigenmengen hochtitrige Antiseren, wie die Arbeitsverdünnung der IgG-Lösung im RIA von bis zu 1:900.000 zeigt. Zum sicheren Ausschluß von Serumproteinverunreinigungen wurde bei allen Antiseren eine Absorption mit lyophilisiertem Normalserum durchgeführt. Da anschließend mittels der Protein A-Säule eine reine IgG-Lösung gewonnen wurde, konnte eine Beeinträchtigung weiterer Untersuchungen durch überschüssiges Absorptionsmaterial weitgehend ausgeschlossen werden.

Immunad/desorptionsstudien

Basierend auf der zur Zeit gültigen Theorie, nach der die sauren und alkalischen Eigenschaften der Organferritine von dem Mischungsverhältnis ihrer Untereinheiten H und L im Molekül abhängig sind (117, 166) (siehe "2.1.4 Isoferritine und ihre immunologischen Eigenschaften") und unter der Voraussetzung, daß die beiden verschiedenen Untereinheiten durch jeweils verschiedene antigene Determinanten gekennzeichnet sind, müßte es möglich sein, Antiseren herzustellen, durch welche die sauren und alkalischen Ferritine desselben Organs immunologisch unterschieden werden können. Mit den gewonnenen nativen Antiseren war, obwohl mit jeweils sauren und alkalischen Ferritinfraktionen immunisiert worden war, im Ouchterlony-Test eine Differenzierung zwischen den sauren und den alkalischen Ferritinen des jeweiligen Organs nicht möglich - was auf die Überwiegende Bildung von Antikörpern gegen die bei sauren und alkalischen Ferritinen gemeinsam vorkommenden anti-

genen Determinanten zurückgeführt werden muß. Bereits HAZARD et al. (123) und JONES (147) berichteten von Erfolgen, Anti-HeLa-Ferr. durch Absorption mit Leber-Apoferritin (123) bzw. Milz-Ferritin in seiner Spezifität für saure Ferritine zu steigern (siehe "2.1.4 Isoferritine und ihre immunologische Heterogenität"). In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, durch wechselweise Ad/Desorption an Säulen, an welche saures bzw. alkalisches Plazentaferritin gekoppelt war, eine Auftrennung des Immunglobulin G in solche Antikörper, welche gegen die kennzeichnenden antigenen Determinanten der sauren Ferritine und solche, welche gegen diejenigen der alkalischen Ferritine gerichtet waren, zu erreichen.

Die Tatsache, daß die Antiseren gegen saure und alkalische Ferritine aus Plazenta- bzw. Lungenkarzinomgewebe trotz Immunisierung mit eindeutig sauren bzw. alkalischen Fraktionen bei Prüfung im Ouchterlony-Test nicht die gewünschte Spezifität besaßen, weist unter der Voraussetzung, daß Kaninchen zur Antikörperbildung gegen die jeweils sauren bzw. alkalischen Eigenschaften kennzeichnenden antigenen Determinanten befähigt sind, auf das Vorherrschen von das ganze Isoferritinspektrum des jeweiligen Organs kennzeichnenden antigenen Determinanten hin. Kein Unterschied bestand auch interessanterweise zwischen den Antiseren gegen Plazentaferritin und denen gegen Ferritin aus Lungenkarzinomen.

Die deutliche Spornbildung in der Reaktion des A-HHF mit der sauren Fraktion des Ferritins aus Lungenkarzinomen gegenüber der Reaktion mit dem alkalischen Anteil weist auf einen immunologischen Unterschied zwischen der sauren und der alkalischen Fraktion des Lungenkarzinomferritins hin. Daß allerdings die Spezifität des Anti-Herz-Gesamtferritins (A-HHF) für saure Ferritine noch relativ gering ist, zeigt die deutliche Reaktion von A-HHF mit Leberferritin sowie ein relativ glatter Übergang der Immunkomplexlinien der Reaktion zwischen A-HHF und einer sauren Fraktion des Lungenkarzinom-Ferritins und der zwischen A-HHF und Leber-Ferritin. Eine Unterscheidung zwischen sauren und alkalischen Plazentaferritinen durch A-HHF fand nicht statt - zu dis-

kutieren wäre hierfür ein von FRENKEL et al. (96) beschriebener, schädigender Einfluß der Hitzefällung.

Da der Ouchterlony-Doppeldiffusionstest nur relativ grobe antigenetische Unterschiede aufdeckt, sollte die Testung der Antisera im RIA genauere Aufschlüsse geben.

Radioimmunoassay

Markierung und Reinigung des markierten Antigens

Die Mehrzahl der Autoren führte die Markierung des Ferritins nach der Chloramin T-Methode durch; eine Übersicht darüber gibt Tab. 17. Pro μg Ferritin wurden zwischen 0,25 (239) und $100\mu\text{Ci}$ (73, 123, 184, 190) Radioaktivität zugegeben. Die Relation Radioaktivität/Protein lag in unserer Markierung bei $60\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Protein, also deutlich über der von PORTER (239), GHIELMI et al. (99) sowie MARCUS und ZINBERG (190) beschriebenen, jedoch unter der von DEPPE et al. (73), HAZARD et al. (123) und LUXTON et al. (184). Eine Beeinträchtigung der Immunreaktivität des Proteins ist HUNTER (130) und BOLTON et al. (38) zufolge vor allem durch das Oxidationsmittel Chloramin T möglich. Das Verhältnis von $10\mu\text{g}$ Chloramin T/ μg Ferritin bei vorliegender Arbeit liegt über den Werten anderer Autoren (73, 99, 123, 184, 190, 239), das von $12\mu\text{g}$ Na-Disulfit/ $5\mu\text{g}$ Protein über dem bei PORTER (239), jedoch unter denen der anderen Untersucher (73, 99, 123, 184, 190). PORTER (239) reinigte das markierte Protein von nicht gebundenem ^{125}I mittels Dialyse. GHIELMI et al. (99) benutzten eine Sepharose 6B-, DEPPE et al. (73) eine Sephadex G 75 - bzw. Sepharose 6B-Säule. Bei vorliegenden Untersuchungen wurde die Entsalzung, wie bei HAZARD et al. (123), LUXTON et al. (184) sowie MARCUS und ZINBERG (190) mit Hilfe einer Sephadex G 25-Säule durchgeführt. Eine anschließende Gelfiltration auf Sepharose 6B bot den Vorteil, bei einer evtl. auftretenden Heterogenität des markierten Proteins die immunreaktivsten Anteile von dem bei der Markierung geschädigten Material trennen zu können. Der als Tracer brauchbare Anteil war in den Fraktionen 38-43 zu finden, jedoch wies der breite, schlecht abgrenzbare Peak auf strukturelle Veränderungen großer Anteile des Proteins hin. Die spezifische Aktivität des markierten Proteins betrug nur $6,3\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Protein, d.h. weniger, als bei GHIELMI et al. (99), jedoch wesent-

lich mehr, als bei PORTER (239). BOLTON et al. (38) fanden bei einem Vergleich zwischen Ferritin, das nach der Chloramin T-Methode jodiert, und solchem welches nach der BOLTON-HUNTER-Methode markiert worden war, eine verminderte immunologische Aktivität und eine verminderte Stabilität des unter direkter Anwendung oxidativer Methoden produzierten Tracers.

Als Alternativen boten sich die technisch einfacher durchzuführende Markierung des Antikörpers (146, 255), was allerdings zur Etablierung eines immunradiometrischen Assays führte, oder, um beim RIA zu bleiben, die schonendere Methode der Ferritinmarkierung nach BOLTON-HUNTER an (37, 38), bei der das Protein nicht direkt mit aggressiven Oxidantien in Berührung kommt. Diese Methode wurde von verschiedenen Untersuchern (28, 38, 220) und nach o.g. negativen Erfahrungen mit der Chloramin T-Methode auch in vorliegender Arbeit angewandt.

Die Verwendung einer HPLC UltroPac-Gelchromatographiesäule zur Reinigung des Tracers ergab eine scharfe Auftrennung des Reaktionsgemischs ohne jegliche Hinweise auf eine Zerstörung des markierten Ferritins wie bei der Chloramin T-Methode. Die im Vergleich zur Chloramin T-Methode verhältnismäßig hohe spezifische Aktivität von $17,3 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ Protein läßt sich vor allem dadurch erklären, daß die Markierung nach BOLTON-HUNTER vom Vorhandensein der beim Ferritin relativ spärlich vorkommenden Tyrosylreste (2, 9, 96) unabhängig erfolgt (37) und mehr Radioaktivität (1-2 mCi) eingesetzt wurde.

Antikörperverdünnungskurve

Die von den einzelnen Autoren angegebenen maximalen Bindungen betrugen nach AROSIO et al. (12) je nach Tracer zwischen 60% und 80%, nach DEPPE et al. (73) 90-93% und nach HAZARD et al. (123) 90-95%. In vorliegender Arbeit lagen sie je nach verwendetem Antikörper zwischen 80% und 85%; für das Antiserum Nr. 52 PA/3-d/3-a/3, welches für den Radioimmunoassay eingesetzt wurde, betrug sie 87% bei einer Verdünnung von 1:5000.

Standardinhibitionskurve und Testansatz

Die Standardkurven sämtlicher getesteter Antiseren erwiesen sich als Geraden über einen Meßbereich von 5-500 ng/ml. Aus der Parallelität der Standardkurven für Leberferritin (BECTON & DICKINSON) sowie für alkalisches und saures Plazenta-ferritin konnte für die geprüften Antiseren auf fehlende immunologische Unterscheidbarkeit der verschiedenen Ferritine geschlossen werden. Im Gegensatz dazu war über divergierende Standardkurven von AROSIO et al. (12) und HAZARD et al. (121) bei Verwendung saurer (HeLa) und alkalischer (Leber) Standards sowie von KONIJN et al. (166) bei Einsatz saurer und alkalischer Anteile von Plazenta-ferritin als Standard berichtet worden.

Ein großes Hindernis beim Vergleich der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen ist die Zugrundelegung unterschiedlicher Standardpräparationen. So wurden bei Vergleichsmessungen mit dem Test der Fa. BEHRINGWERKE wesentlich höhere Werte ermittelt als mit dem Test von CLINICAL ASSAYS oder BECTON & DICKINSON, während die mit Abstand niedrigsten Werte der Kit von RAMCO erbrachte (192, 219). In Ermangelung international gültiger Ferritin-Standardpräparationen wurden beim eigenen Test der Leberferritin-Standard von BECTON & DICKINSON und für saure bzw. alkalische Ferritin-Standards eigene Präparationen verwandt.

Die Wahl des geeigneten Antikörperproduzenten ist immer noch eine Streitfrage. Während von einigen Autoren der Maus (12), dem Meerschweinchen (147, 191), bzw. dem Schaf (191) als bessere Antikörperbildner gegen saure Ferritine der Vorzug gegeben wird, ist es jedoch JONES und WORWOOD (146) gelungen, auch mit Hilfe des Kaninchens ein Antiserum gegen saures Herzferritin herzustellen. Bei vorliegender Arbeit wurde aufgrund der o.g. Erfahrung von JONES und WORWOOD und wegen der größeren Serummenge ausschließlich das Kaninchen als Antikörperproduzent gewählt. Die sehr aufwendige und daher Speziallaboratorien vorbehaltene Herstellung monoklonaler Antikörper würde auf Mäuse oder Ratten angewiesen sein.

Bedeutenden Einfluß auf die Empfindlichkeit des Assays hat die Menge des eingesetzten markierten Proteins. Einerseits muß die Radioaktivität groß genug sein, um durch ausreichende Unterschiede in den Count-Zahlen eine präzise Messung zu gewährleisten, andererseits darf das Protein nicht durch Zugabe zu großer Mengen an Aktivität geschädigt werden. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Aktivität liegt mit 15.000 - 20.000 cpm/Röhrchen (100µl) zwischen den Werten von HAZARD et al. (123) mit 9000 cpm und DEPPE et al. (73) mit 35.000 cpm. Da das markierte Ferritin jedoch aus unterschiedlichen Präparationen stammt, sind die angegebenen Werte nur bedingt vergleichbar.

HAZARD et al. (121) benutzten als ersten Antikörper Anti-Leberferritin-Serum vom Kaninchen in einer Verdünnung von 1:500.000, während die eingesetzte Verdünnung bei AROSIO et al. (12) 1:40.000 betrug. Da das in unserer Arbeit verwendete Antiserum Nr. 52 PA/3-d/3-a/3 nach Isolierung der IgG-Fraktion auf der Protein A-Säule und anschließender sequentieller Immunad/desorption etwa um den Faktor 10 eingengt wurde, entspricht die Arbeitsverdünnung der IgG-Lösung von 1:700.000 einer realen Verdünnung des Vollserums von etwa 1:70.000. Mit dieser Verdünnung wurde eine Bindungsaktivität von 39,1% erreicht, was sich in etwa mit der von HAZARD et al. (123) angestrebten Bindung von 30-50% deckt, jedoch deutlich unterhalb der Bindung von 65% bei DEPPE et al. (73) liegt. Die unspezifische Bindung war mit $N < 1\%$ vernachlässigbar gering.

Der Meßbereich unseres eigenen Radioimmunoassays lag mit 5-500 ng/ml optimal, während nach GRAIL et al. (103) sieben verschiedene kommerzielle Kits nur in den Konzentrationsbereichen 30-400 ng/ml (IRMA), 6-230 ng/ml (IRMA), 10-208 ng/ml (EIA), 10-240 ng/ml (RIA), 10-200 ng/ml (RIA), 14-300 ng/ml (RIA) und 10-300 ng/ml (RIA) zuverlässig arbeiteten.

2.2.4.2 Serumferritin-Bestimmung bei Normal- und Patientenkollektiven

Die durchgeführten Serumferritin-Bestimmungen sollten als Anwendungsbeispiel des etablierten Assays der Festsetzung einer oberen Normgrenze sowie einem groben Vergleich mit den Ergebnissen anderer Untersucher dienen. Die Bearbeitung größerer und dadurch repräsentativer Normal- und Patientenkollektive war im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen.

Die Serumwerte unseres aus 269 jungen Männern bestehenden Normalkollektivs lagen nach Median und arithmetischem Mittelwert vergleichbar mit den Ergebnissen vieler Autoren (19, 59, 103, 122, 128, 135, 146, 149, 202, 213, 226) im Mittelfeld, während von einer Anzahl anderer Untersucher (5, 60, 74, 111, 132, 144, 151, 184, 190, 193, 214, 279) z.T. wesentlich höhere Werte, in einem Fall niedrigere Werte (138) gefunden wurden (siehe "2.1.11.1 Normalwerte").

Niedrigere Werte wurden auch bei Verwendung des RIA-Gnost (IRMA) in einem anderen Normalkollektiv ermittelt:

	N	Bereich (ng/ml)	geometr. Mittel (ng/ml)
Männer	150	12 - 150	46,0
Frauen	200	12 - 58	23,0

Bei der Interpretation von Normalwerten sollte der in Kapitel "2.1.11.1 Normalwerte" beschriebene Einfluß von Geschlecht (5, 74, 89, 103, 135, 144, 149, 151, 153, 184, 190, 193, 201, 202, 244, 268, 296) und Alter (89, 244) nicht übersehen werden.

Weitgehende Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Untersucher ergab sich bei unseren Gruppen von Pankreaskarzinom (137, 213) und Mammakarzinom (147, 190). Beim Magenkarzinom wiesen rund 31% der Patienten erhöhte Werte auf, wobei in der Literatur über deutliche Steigerungen erst bei Vorhandensein von Metastasen berichtet wird (5, 137). Eine Differenzierung in lokalisierte und generalisierte Magenkarzinome war im Rahmen unserer Arbeit aufgrund eines zu kleinen Kollektivs nicht möglich. In Fällen von Colonkarzinom war eine Erhöhung in 30,9% der Fälle

nachweisbar. Von Seiten anderer Untersucher sind allerdings keine Ergebnisse von Kollektiven repräsentativer Größe bekannt. Eine Differenzierung nach Histologie und Stadium erscheint lohnenswert. Jeweils rund 44% der Serumwerte von Ovarialkarzinomen bzw. malignen Hodentumoren lagen über der Normgrenze, während von LAMERZ (168) in 67% der Ovarialkarzinome und von LINKESCH et al. (179) in 0% der nicht metastasierten gegenüber 63% der metastasierten malignen Hodentumoren erhöhte Werte angegeben wurden. Weitgehend übereinstimmend mit den Ergebnissen von ISHITANI et al. (137) überschritten in unserem Kollektiv von Bronchialkarzinompatienten 62% die Norm, während von LAMERZ (168) über 77% und von GROPP et al. (107, 108, 109) je nach Metastasierung über 66-100% pathologische Spiegel berichtet wurde.

Als Beispiel für nicht maligne Erkrankungen diente ein Leberzirrhose-Kollektiv. Dabei wiesen 53% der Patienten über die Normgrenze erhöhte Serumferritinwerte auf.

Obwohl bei verschiedenen onkologischen Kollektiven signifikante Erhöhungen des Serumferritins vorliegen, darf nicht die Tatsache vernachlässigt werden, daß es sich bei der Gesamt-Serumferritin-Bestimmung um eine unspezifische Methode handelt, welche prinzipiell keine Unterscheidung zwischen malignen und nicht malignen Erkrankungen zuläßt. Dadurch reduziert sich - solange keine onkologischen Merkmale der Isoferritine bestimmt werden können - der Einsatz als Tumormarker auf die Therapie- und Verlaufsbeurteilung unter Berücksichtigung anderer Ursachen für eine Vermehrung des Ferritins im Serum.

2.2.5 Illustrationsmaterial zum Abschnitt
"2.2 Eigene Untersuchungen"

2.2.5.1 Abbildungen

Ferritin-Isolierung

A. Extraktion aus Plazentagewebe

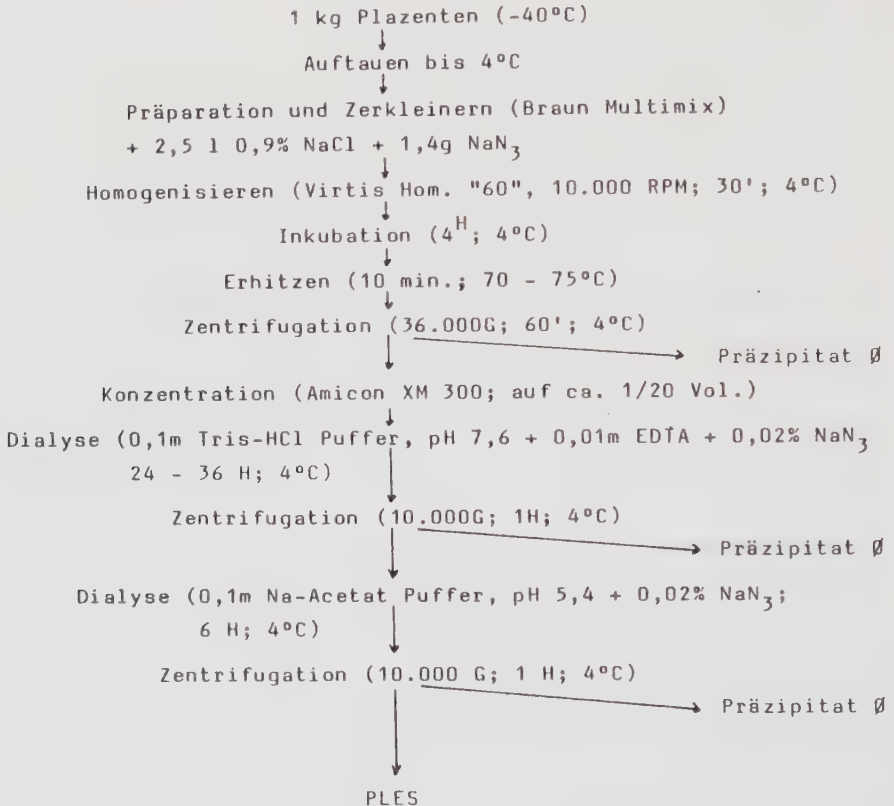


Abb. 4

B. Extraktion aus Lungenkarzinomgewebe

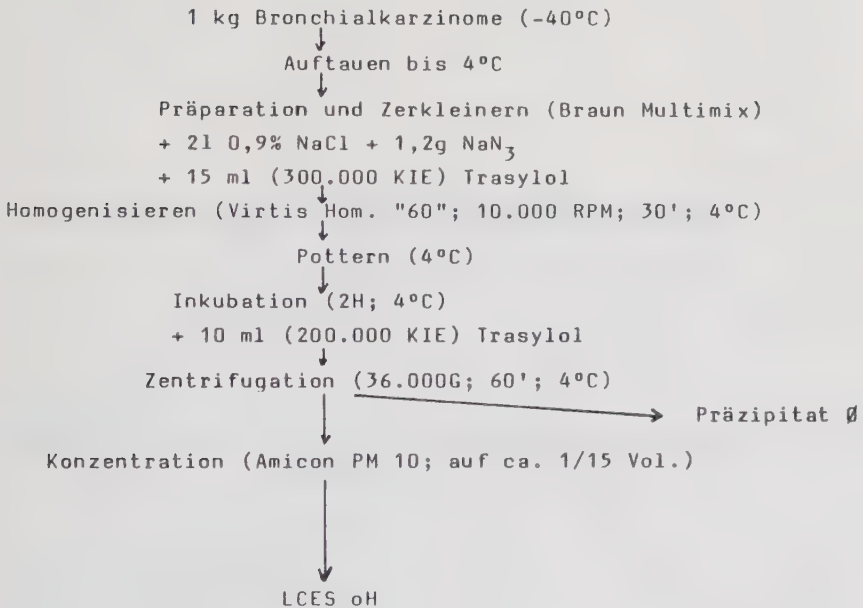
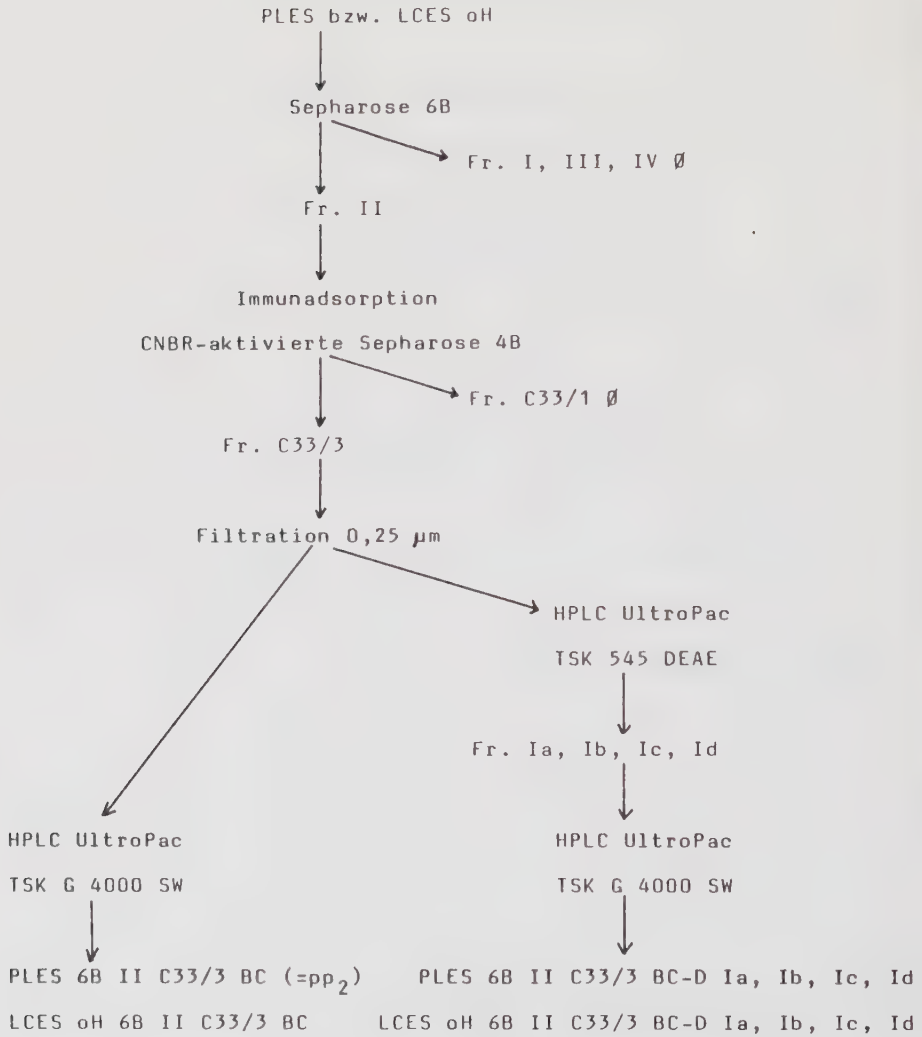


Abb. 5

C. Säulenchromatographie



GELFILTRATION VON SALINEM PLAZENTA - EXTRAKT (PLES)

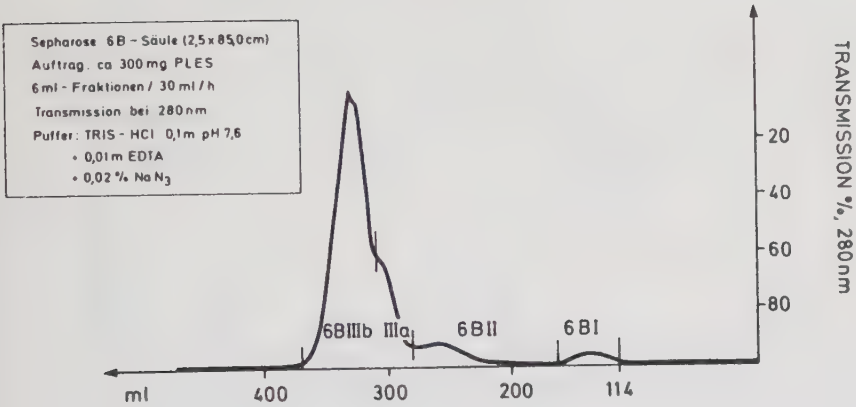


Abb. 7

GELFILTRATION VON SALINEM LUNGENKARZINOMEXTRAKT (LCES o. H.)

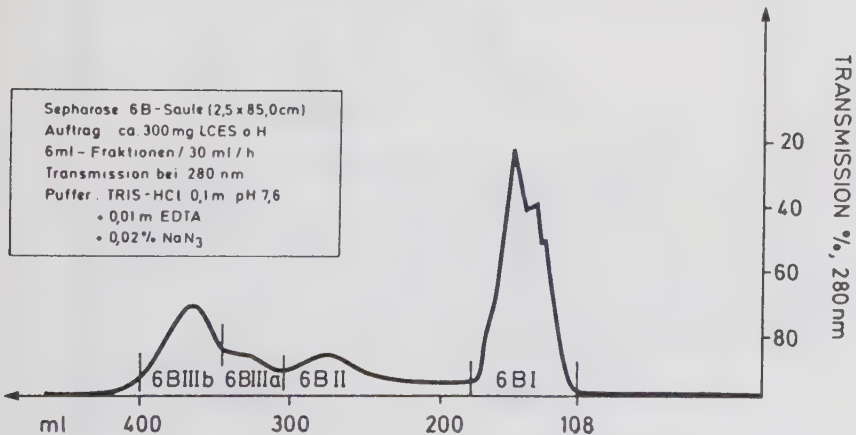


Abb. 8

Abb. 9: Immunodiffusionsuntersuchung der PLES-Fraktionen nach Chromatographie auf Sepharose 6B im Ansatz gegen Anti-Plazenta-Gesamtferritin-Serum (A-pp₂) und Anti-Lactoferrin-Serum (A-Lact.). Die oben verwandten Bezeichnungen I, II, III und IV für die Fraktionen von PLES 6B entsprechen in der gleichen Reihenfolge den in Abb. 7 und im Text gebrauchten Bezeichnungen I, II, IIIa und IIb. Ausschließliche Reaktion von PLES 6B II mit A-pp₂.

Abb. 10: Immunodiffusionsuntersuchung der Fraktion PLES 6B II im Ansatz gegen Anti-Plazenta-Gesamtferritin-Serum (A-pp₂), Anti-Lactoferritin-Serum (A-Lacto), Anti-Transferrin-Serum (A-Trans), Anti-Haptoglobin-Serum (A-Hapto), Anti-Immunglobulin-Serum (A-Img), A-Glycoprotein-Serum (A-GP), Anti-Albumin-Serum (A-Alb) und gegen Anti-Humanserum (AHS). Breite, deutliche Präzipitatabildung mit A-pp₂ und A-Alb, schwache Linien mit A-Trans und A-Img.

Abb. 11: Immunodiffusionsuntersuchung der Fraktionen LCES oH 6B I, II, IIIa und IIb im Ansatz gegen Anti-Lactoferrin-Serum (A-Lact.), Anti-Humanserum (AHS) und Anti-Plazenta-Gesamtferritin-Serum (A-pp₂). Präzipitationslinienbildung von A-pp₂ ausschließlich gegen LCES oH 6B II; starke Reaktion von LCES oH 6B II mit AHS, schwache Reaktion mit A-Lact.

PLES-68

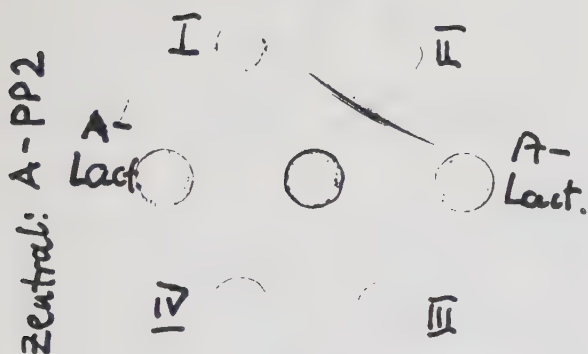


Abb. 9

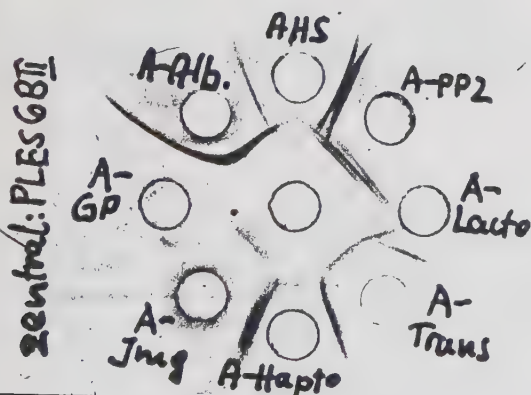


Abb. 10

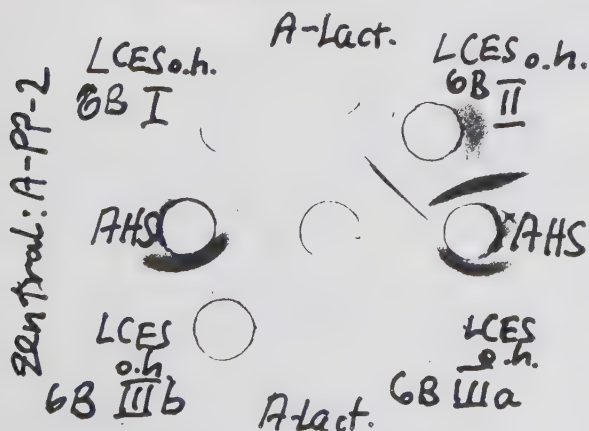


Abb. 11

IMMUNADSORPTION VON PLAZENTA-FERRITIN

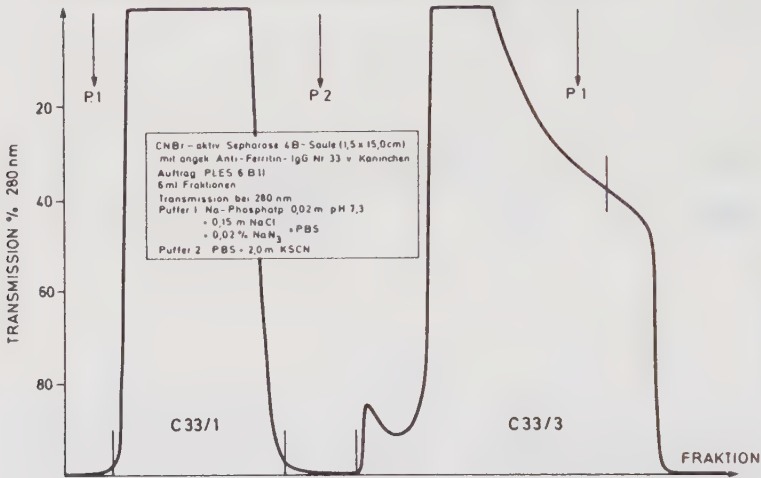


Abb. 12

IMMUNADSORPTION VON LUNGENKARZINOM-FERRITIN

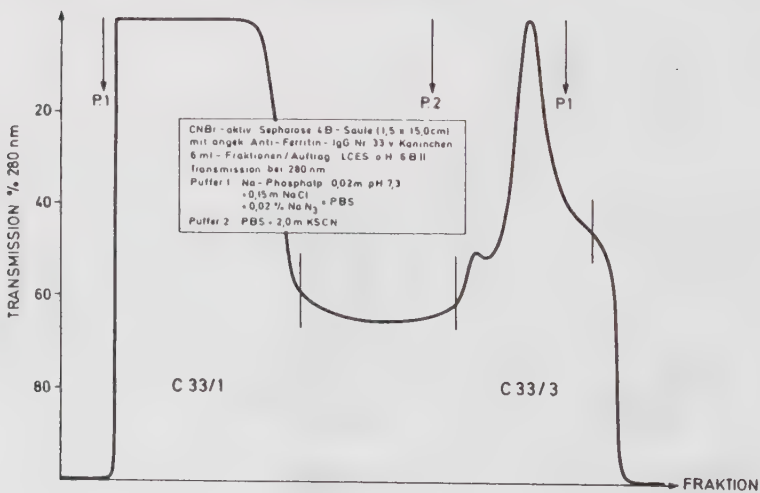


Abb. 13

Abb. 14: Immunodiffusionsuntersuchung von PLES 6B II C33/1 (links) und /3 (rechts) im Ansatz gegen Anti-Plazenta-Gesamt-ferritin-Serum (A-pp₂), Anti-Transferrin-Serum (A-Trans), Anti-Haptoglobin-Serum (A-Hapto), Anti-Immunglobulin-Serum (A-Img), Anti-Albumin-Serum (A-Alb) und Anti-Humanserum (AHS). Ausschließliche Reaktion von A-pp₂ gegen Fraktion C33/3.

Abb. 15: Immunodiffusionsuntersuchung von LCES oH 6B II C33/1 (links) und /3 (rechts) im Ansatz gegen Anti-Plazenta-Gesamt-ferritin-Serum (A-pp₂), Anti-Lactoferrin-Serum (A-Lact), Anti-Transferrin-Serum (A-Trans), Anti-Haptoglobin-Serum (A-Hapto), Anti-Immunglobulin-Serum (A-Img), Anti-Glycoprotein-Serum (A-GP), Anti-Albumin-Serum (A-Alb) und gegen Anti-Humanserum (AHS). Präzipitationslinien der Fraktion C33/3 mit A-pp₂; schwach sichtbare Linienbildung mit A-Img und A-Alb, A-Trans und A-Lact.

Abb. 16: Immunodiffusionsuntersuchung der Fraktionen PLES 6B II C33/3 BC-D Ia (entspricht in der Abb. der Fraktion I), Ib (II), Ic (III) und Id (IV) im Ansatz gegen Anti-Plazenta-Gesamtferri-tin-Serum (A-pp₂) und Anti-Humanserum (AHS). Reaktion der Fraktionen Ia bis Ib mit A-pp₂, schwache Reaktion von AHS mit Frak-tion III.

Abb. 17: Immunodiffusionsuntersuchung der Fraktionen LCES oH BC-D Ia (entspricht in der Abb. der Fraktion I), Ib (II), Ic (III) und Id (IV) im Ansatz gegen Anti-Plazenta-Gesamtferri-tin-Serum (A-pp₂) und Anti-Humanserum (AHS). Ausgeprägte Reaktion der Fraktionen Ia bis Ib mit A-pp₂; schwach angedeutete Reak-tion mit AHS.

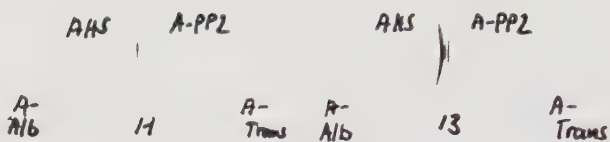


Abb. 14

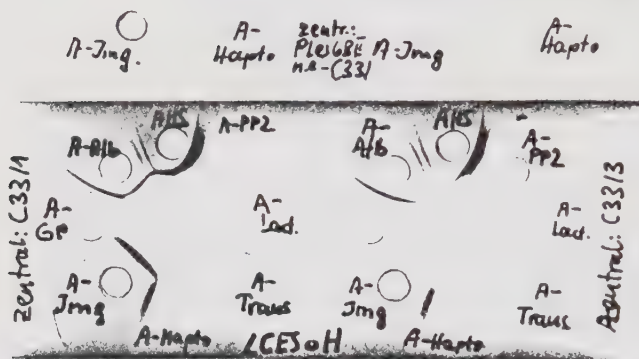


Abb. 15

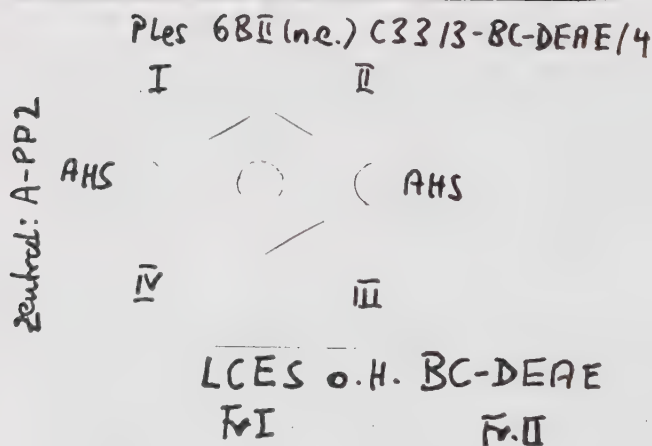


Abb. 16

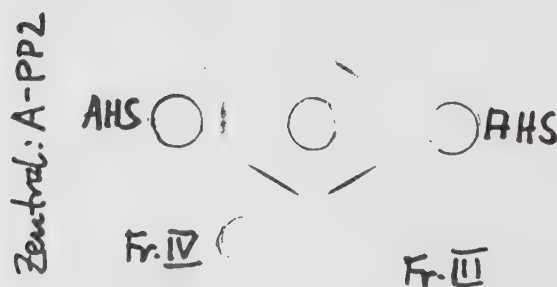


Abb. 17

HPLC - ANIONEN - AUSTAUSCHER - CHROMATOGRAPHIE VON PLAZENTA - FERRITIN

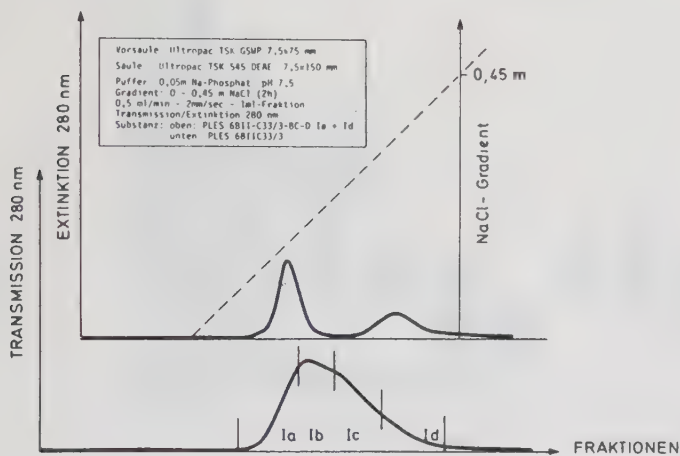


Abb. 18

HPLC - ANIONEN - AUSTAUSCHER - CHROMATOGRAPHIE VON LUNGEN - KARZINOM - FERRITIN

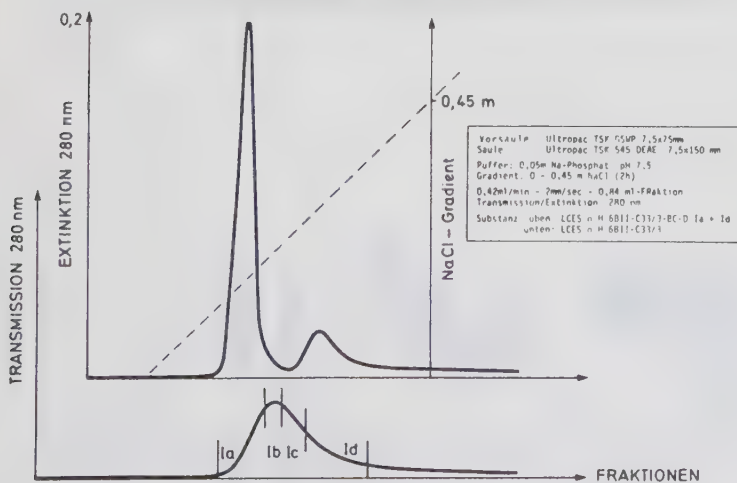


Abb. 19

ISOELEKTROFOKUSSIERUNG (pH 4-6) VON PLAZENTA-GEWEBSEXTRAKT-FERRITIN
NACH HPLC-ANTONENAUSTAUSCHER-CHROMATOGRAPHIE

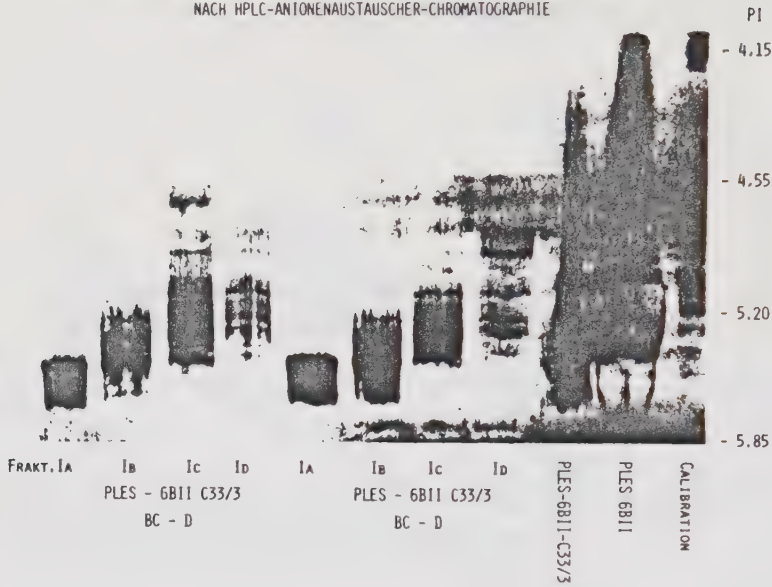
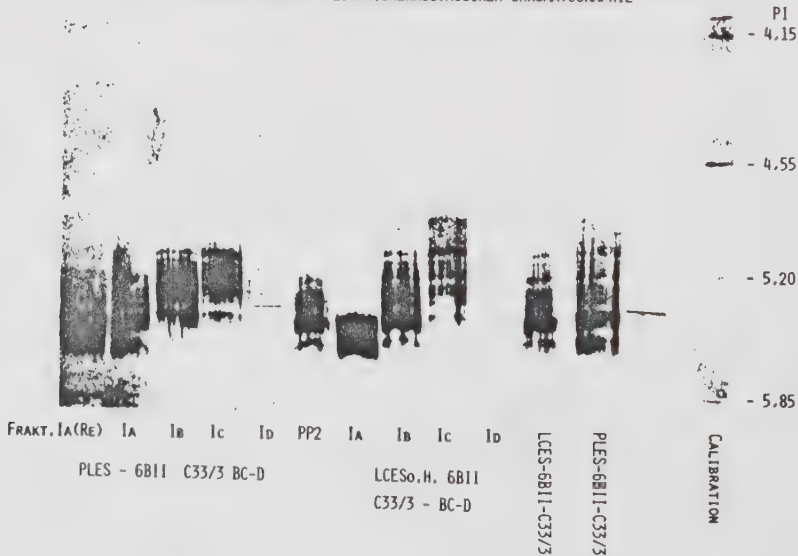


Abb. 20

ISOELEKTROFOKUSSIERUNG (pH 4-6) VON PLAZENTA- UND LUNGENKARZINOM-GEWEBSEXTRAKT-FERRITIN NACH HPLC-ANTONENAUSTAUSCHER-CHROMATOGRAPHIE



HPLC-CHROMATOGRAPHIE VON PLAZENTA-ISOFERRITINEN

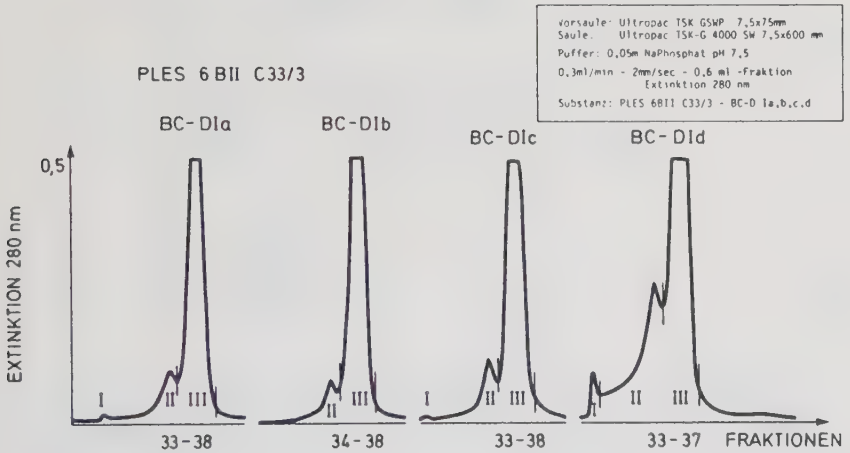


Abb. 22

HPLC-CHROMATOGRAPHIE VON LUNGENKARZINOM-ISOFERRITINEN

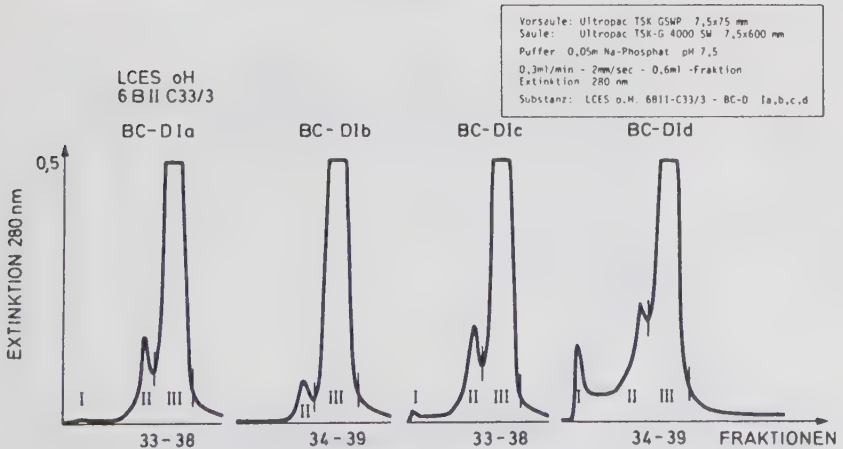


Abb. 23

HOCHAUFÖSENDE GELPERMEATIONS-CHROMATOGRAPHIE VON PLAZENTA-FERRITIN

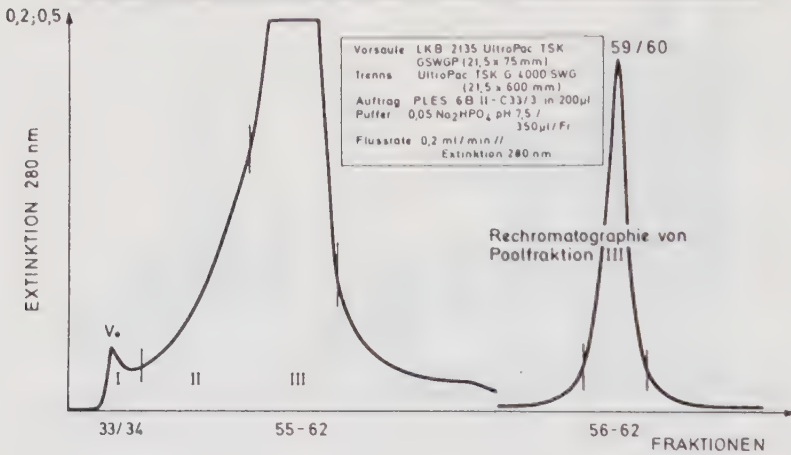


Abb. 24

HPLC VON PLAZENTA-FERRITIN

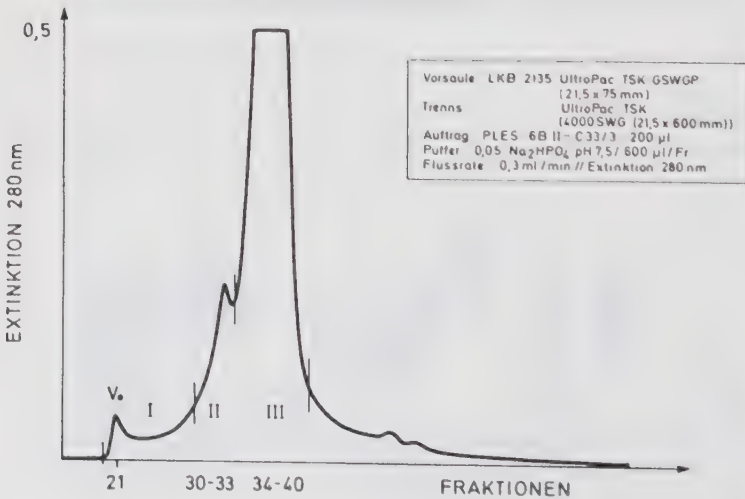


Abb. 25

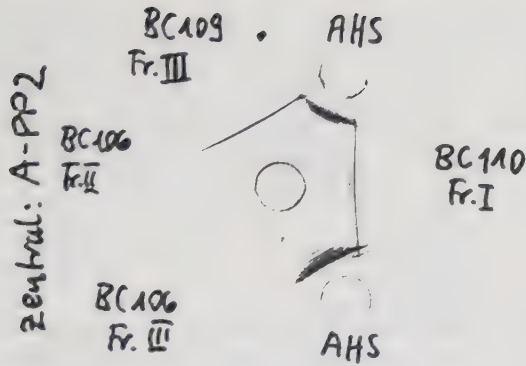


Abb. 26: Immunodiffusionsuntersuchung der Fraktion PLES 6B II C33/3 BC III (in der Abb. BC 109 Fr. III) im Ansatz gegen Anti-Plazenta-Gesamtferritin-Serum (A-pp₂) und Anti-Humanserum (AHS). Reaktion der Fraktion III ausschließlich mit A-pp₂.

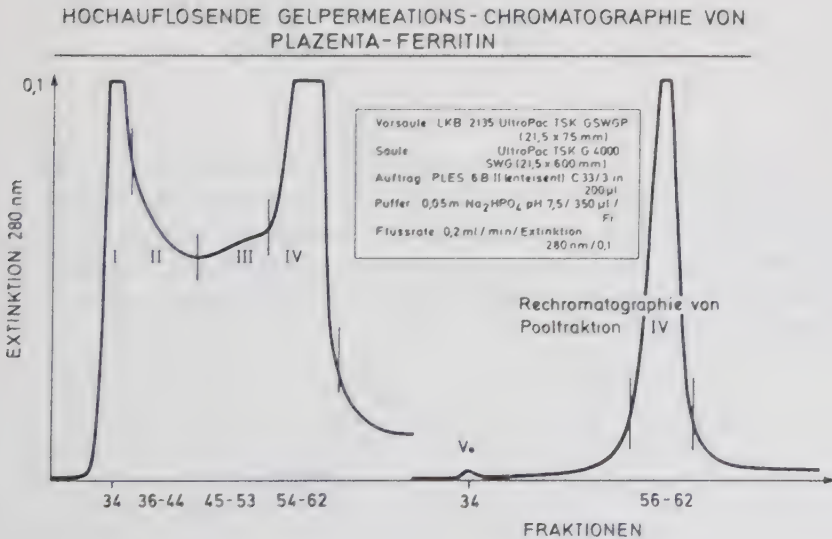


Abb. 27

Abb. 28: Immunodiffusionsuntersuchung der Antiseren Nr. 48 (Anti-Plazenta-Gesamtferritin-Serum) und Nr. 49 (Anti-alkal. Plazentaferritin-Serum) nach Absorption mit Normalserum im Ansatz gegen schwach alkal. Plazentaferritin (pp_2 Ib), PLES 6B II und gegen Normalserum (NS). Keine Reaktion mit Normalserum.

Abb. 29: Immunodiffusionsuntersuchung der Antiseren Nr. 49 (Anti-alkal. Plazentaferritin-Serum) und Nr. 50 (Anti-saures Plazentaferritin-Serum) nach Absorption mit Normalserum im Ansatz gegen LCES oH C33/3 (Lungenkarzinom-Gesamtferritin), Normalserum (NS) und Plazenta-Gesamtferritin (pp_2) und im Vergleich mit Referenz-Anti-Plazenta-Gesamtferritin-Serum (A- pp_2). Komplette Identitätsreaktion der Präzipitationslinien der Antiseren Nr. 49, Nr. 50 und A- pp_2 mit pp_2 . Zusätzliche Auffächerung der Linie zwischen LCES oH C33/3 und Antiseren Nr. 50 gegenüber der Präzipitationslinie zwischen LCES oH C33/3 und Antiserum Nr. 49 (schwächerer Antikörpertiter gegen einen Teil der Isoferritine von LCES C33/3 im Antiserum Nr. 50).

Abb. 30: Immunodiffusionsuntersuchung der Antiseren Nr. 51 (Anti-alkal. Lungenkarzinomferritin) und Nr. 52 (Anti-saures Lungenkarzinomferritin) nach Absorption mit Normalserum im Ansatz gegen Plazenta-Gesamtferritin (pp_2) und Humanserum (HS). Keine Reaktion mit Humanserum. Komplette Identitätsreaktion beider Antiseren gegen pp_2 .

.

■

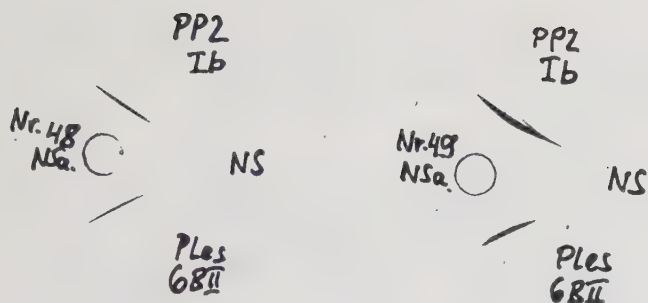


Abb. 28

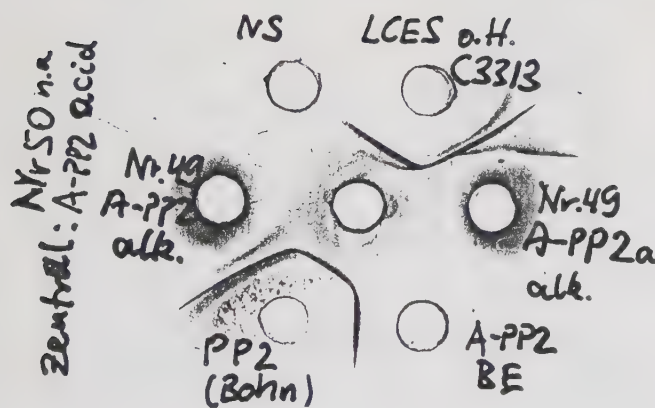


Abb. 29

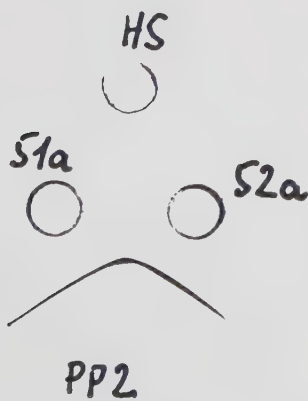


Abb. 30

PROTEIN A-IMMUNADSORPTION VON ANTI-FERRITIN-SERUM

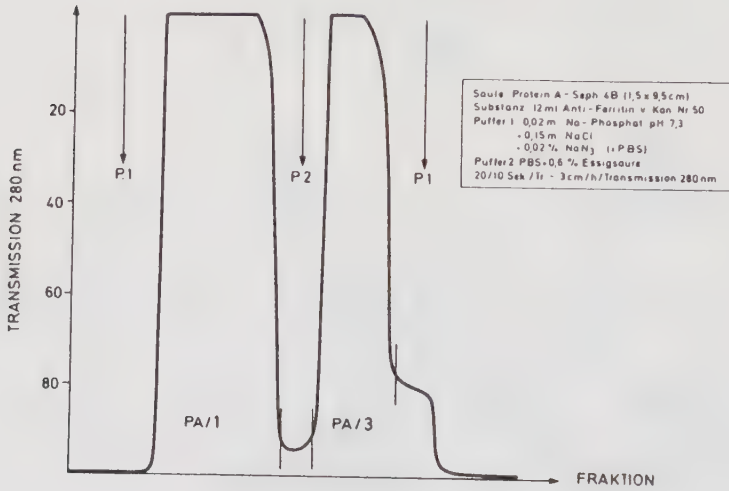


Abb. 31

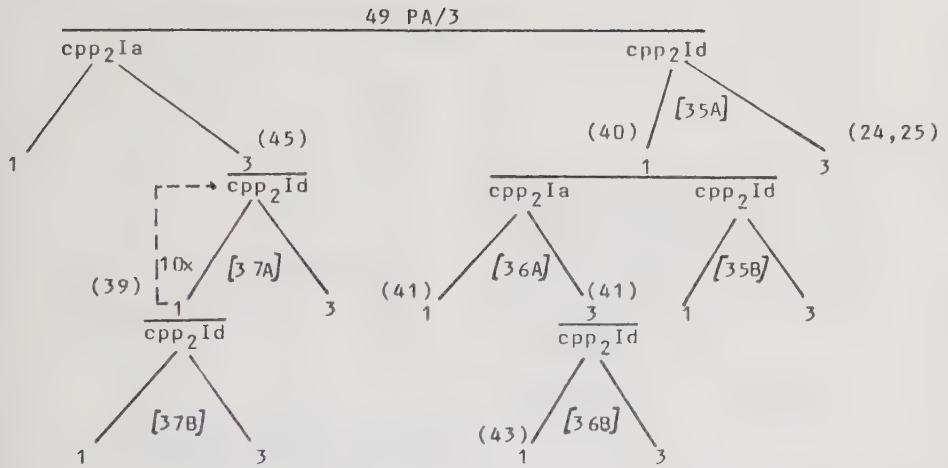


Abb. 32

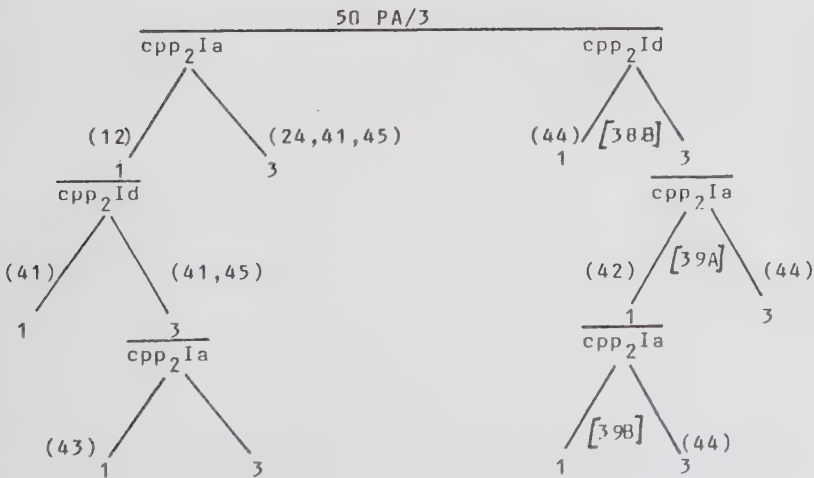


Abb. 33

Abb. 32 und 33: Flußdiagramme der sequentiellen Immunad/desorption der Antiseren 49 PA/3 und 50 PA/3
Die Nummern der den einzelnen Schritten zugehörigen Chromatographiekurven bzw. Ouchterlony-Tests wurden in eckigen [] bzw. runden () Klammern angegeben.

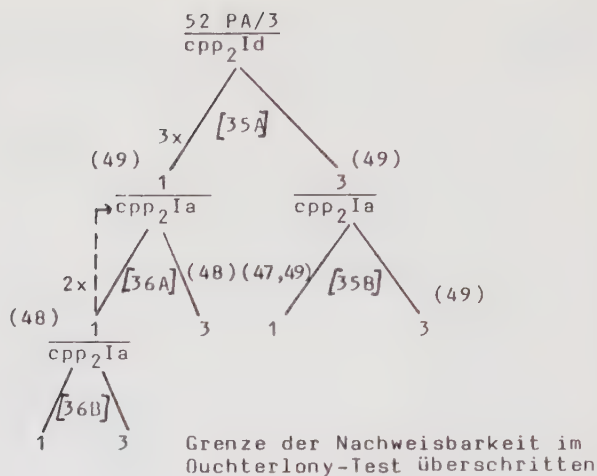


Abb. 34: Flußdiagramm der sequentiellen Immunad/desorption des Antiserums 52 PA/3

Die Nummern der den einzelnen Schritten zugehörigen Chromatographiekurven bzw. Ouchterlony-Tests wurden in eckigen [] bzw. runden () Klammern angegeben.

IMMUNABSORPTION VON ANTI-FERRITIN-SERUM

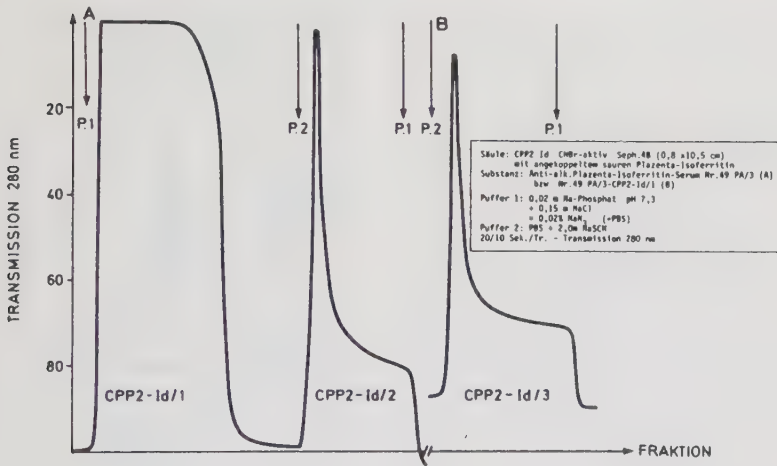


Abb. 35

IMMUNABSORPTION VON ANTI-FERRITIN-SERUM

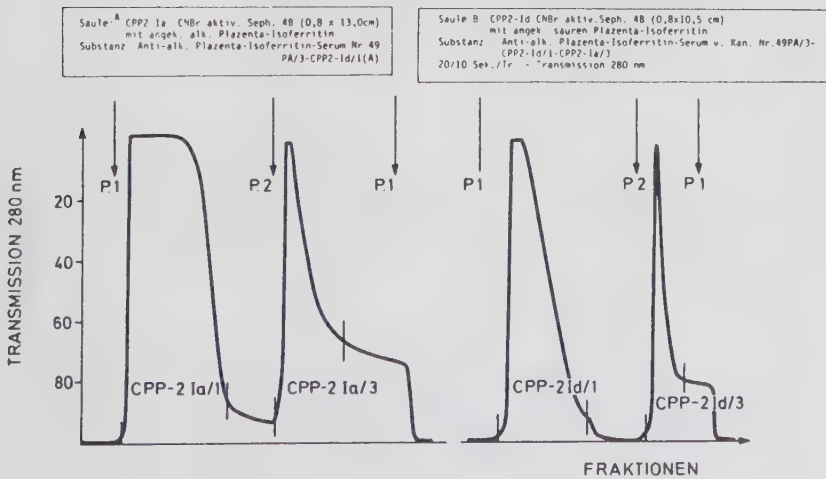


Abb. 36

IMMUN-AD/ABSORPTION VON ANTI-PLAZENTA-FERRITIN-SERUM

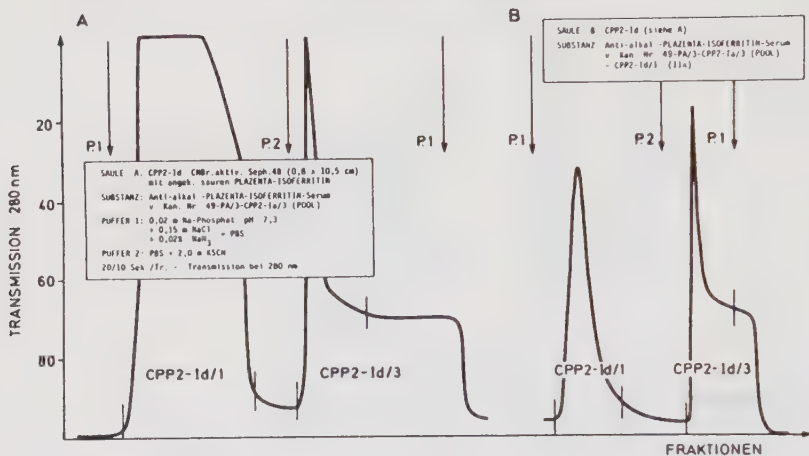


Abb. 37

IMMUNADSORPTION VON ANTI-PLAZENTA-FERRITIN-SERUM

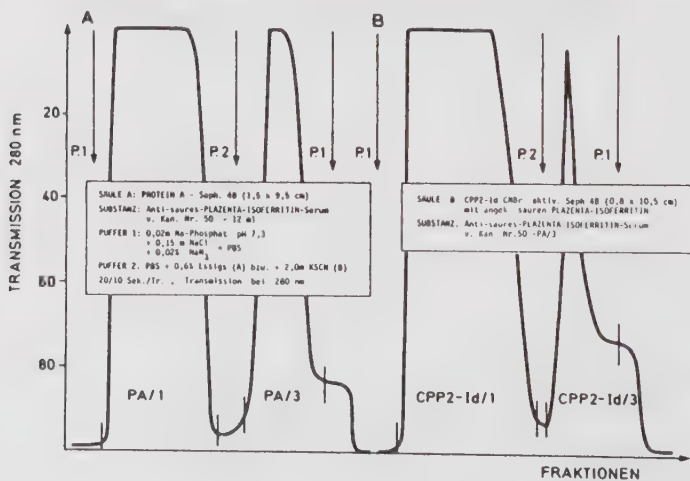


Abb. 38

IMMUN-AD/ABSORPTION VON ANTI-PLAZENTA-FERRITIN-SERUM

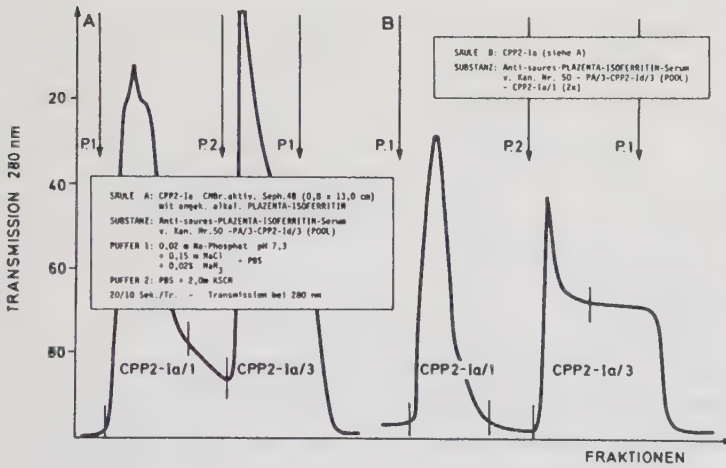


Abb. 39

IMMUN-AD/ABSORPTION VON ANTI-LUNGENKARZINOM-FERRITIN-SERUM

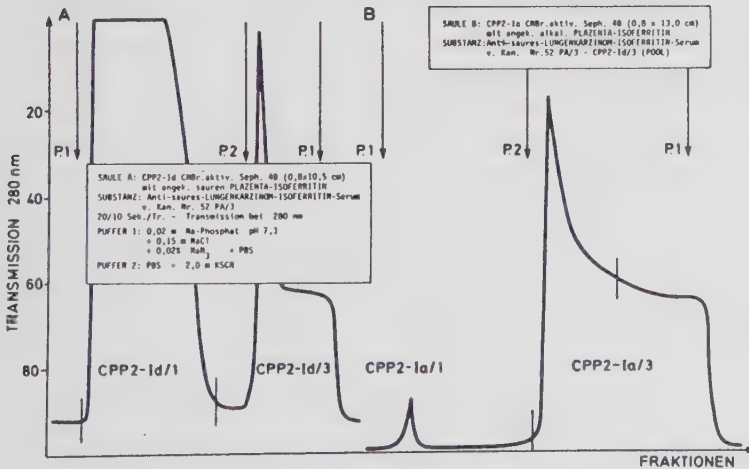


Abb. 40

IMMUN-AD/ABSORPTION VON ANTI-LUNGENKARZINOM-FERRITIN-SERUM

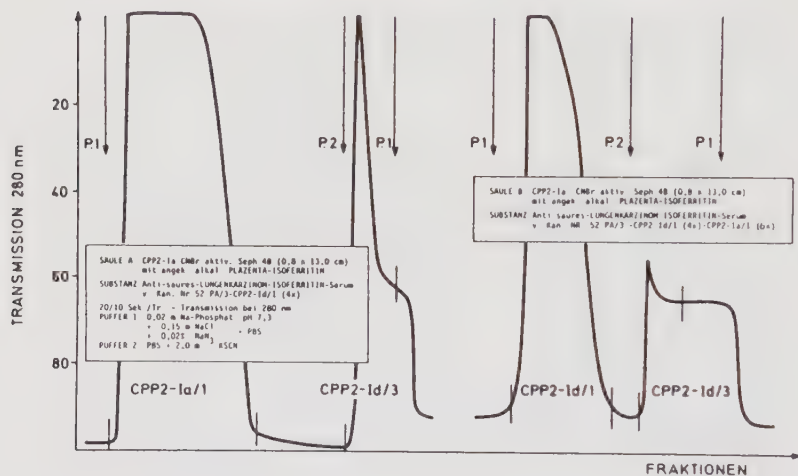


Abb. 41

Abb. 42-53: Immunodiffusionsuntersuchungen der sequentiellen Fraktionen der Antiseren Nr.: 49 (Anti-alkal. Plazentaferritin-Serum) Abb. 42-48, 50), Nr. 50 (Anti-saures Plazentaferritin-Serum) (Abb. 45-50) und Nr. 52 (Anti-saures Lungenkarzinomferritin-Serum) (Abb. 51 und 53) (vgl. Flußdiagramme Abb. 32-34) nach der repetitiven Immunad/desorption im Ansatz gegen Plazenta-Gesamtferritin (pp_2) sowie gegen alkalische (Ia) und saure (Id), bzw. relativ saure (Ic) Anteile von Lungenkarzinomferritin. Kein Anhalt für eine Spezifizierung der Antiseren durch die sequentielle Immunad/desorption, nur zunehmende Reduktion des Gesamtantikörpertiters mit wachsender Anzahl der Ad/desorptionsschritte: 1 $\longrightarrow$... 11x Adsorption an alkalischen (a/1) bzw. sauren (d/1) Ferritinsäulen oder entsprechende Adsorption (a/3 bzw. d/3). In Einzelfällen Doppel- bis Mehrfach-Präzipitationslinienbildung (d/3). In Einzelfällen Doppel- bis Mehrfach-Präzipitationslinienbildung (Abb. 44, 48, 49, 52), jedoch keine Spornbildung oder Kreuzung.

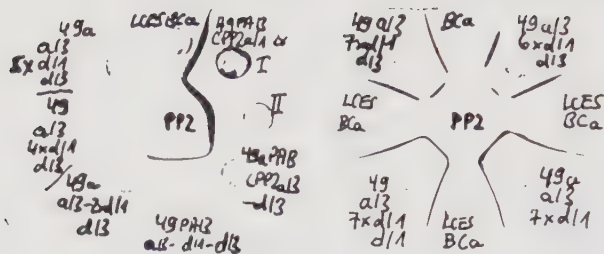


Abb. 42

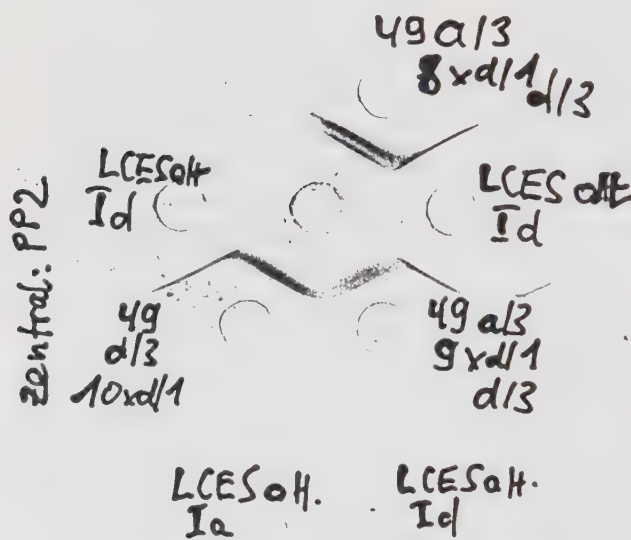


Abb. 43

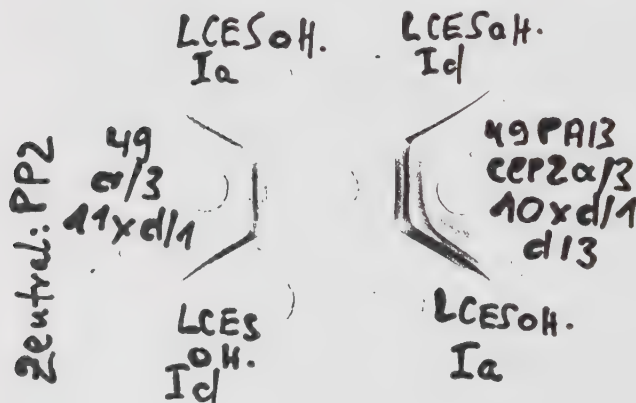


Abb. 44

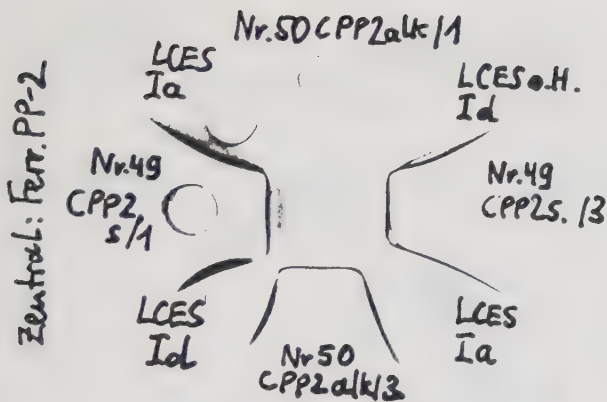


Abb. 45

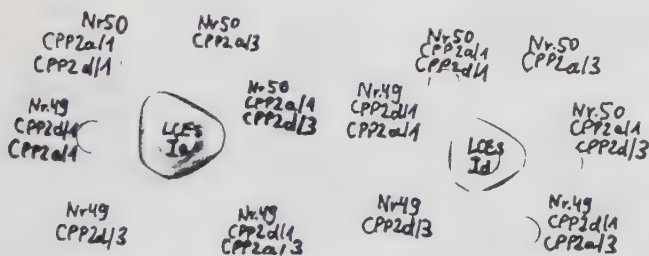


Abb. 46

PP2Ia PP2

LCES
alt
d

LCES
alt
alk.

Central:
SDa
PR-12
CPP2d/3
CPP2a/1

Abb. 47

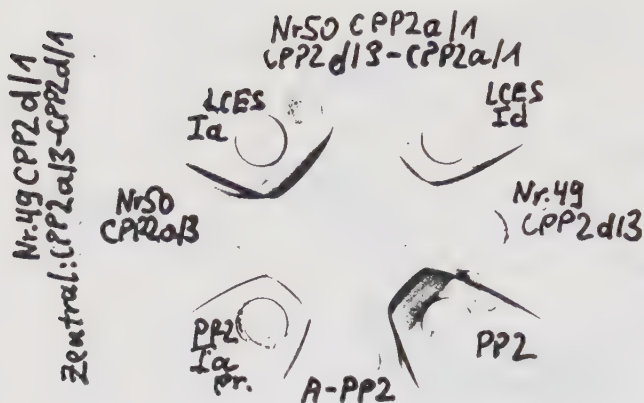


Abb. 48

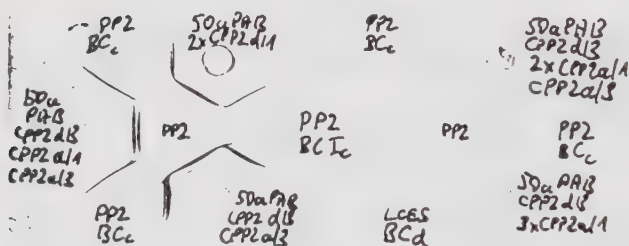


Abb. 49

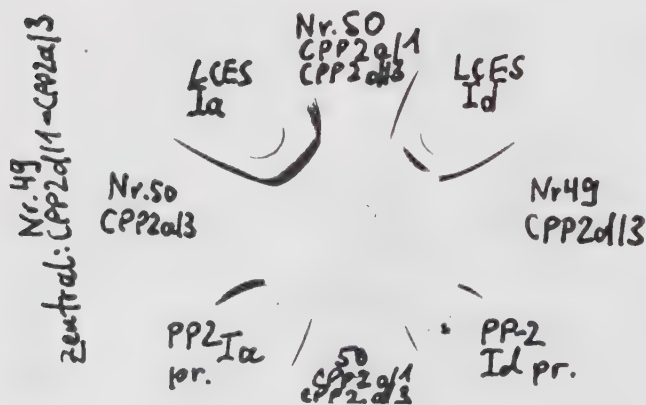


Abb. 50

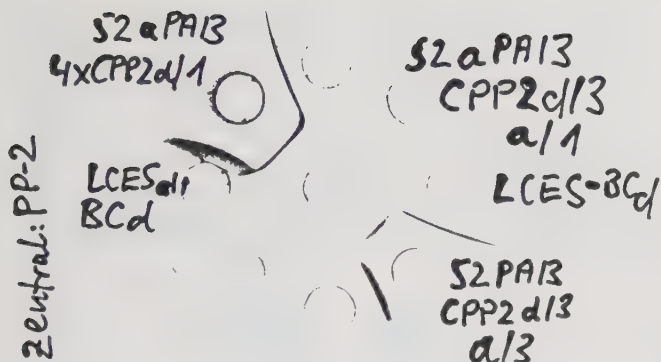


Abb. 51

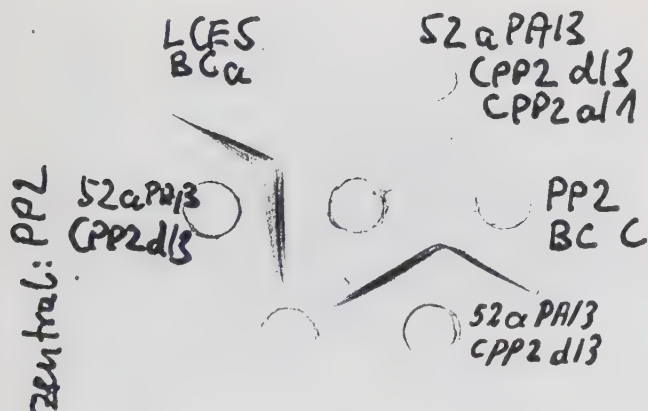


Abb. 52

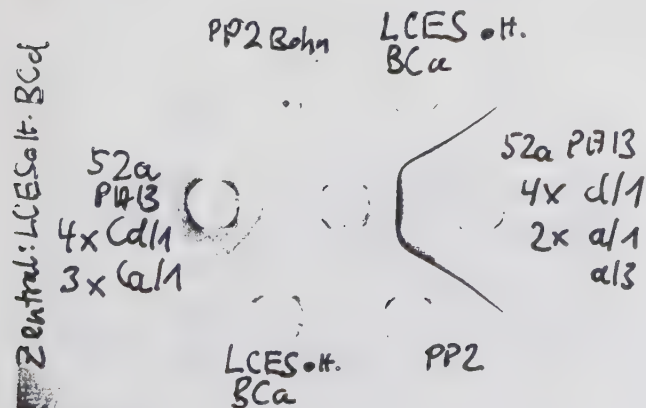


Abb. 53

Abb. 54: Immunodiffusionsuntersuchung der Antikörperfraktionen Nr. 50 PA/3 $\text{cpp}_2\text{Ia}/1$ und $/3$ im Ansatz gegen saure (BC Id) und alkalische (BC Ia) Anteile von Plazentaferritin (PLES) und Lungenkarzinomferritin (LCES). Geringfügige Spornbildung der Präzipitationslinien zwischen Antiserum Nr. 50 PA/3 $\text{cpp}_2\text{Ia}/3$ und den sauren bzw. alkalischen Anteilen von Lungenkarzinomferritin gegenüber den Linien zwischen Nr. 50 PA/3 $\text{cpp}_2\text{Ia}/1$ und den Ferritinanteilen aus Lungenkarzinomen.

Abb. 55: Immunodiffusionsuntersuchung von Antiserum Nr. 52 sowie dessen Fraktion Nr. 52 PA/3 $\text{cpp}_2\text{Id}/3$ im Vergleich mit Referenz-Anti-Gesamtherzferritin-Serum (A-HHF HT 10 WORWOOD, aufgespalten in die Fraktionen $\text{cpp}_2\text{Ia}/1$ und $/3$) im Ansatz gegen den sauren (d, Mitte) und den alkalischen Anteil (a, rechts und links) von Ferritin aus Lungenkarzinomen. Kompletter Übergang der Präzipitationslinien zwischen Antiserum Nr. 52 und dessen Fraktion $\text{cpp}_2\text{Id}/3$ und den beiden Anteilen des Lungenkarzinomferritins. Deutliche Spornbildung in der Reaktion von A-HHF HT 10 WORWOOD $\text{cpp}_2\text{Ia}/3$ mit den alkal. Anteilen von Lungenkarzinomferritin im Vergleich zu den sauren Anteilen (d.h. diese Antikörperfraktion enthält neben Antikörpern gegen saure und alkalische Ferritine auch solche, die ausschließlich mit den sauren Anteilen reagieren).

Abb. 56: Immunodiffusionsuntersuchung von Antiserum gegen menschliches Herz-Gesamtferritin (A-HHF HT 10 WORWOOD) im Ansatz gegen saure (d), mittlere (c, b) und alkalische (a) Anteile von Plazentaferritin (pp_2), saure (d, DEAE III) und alkalische (a) Anteile von Lungenkarzinomferritin (LCES oH) sowie gegen Leber-Gesamtferritin (NLIVES C33/3). Doppellinien in der Reaktion gegen $\text{pp}_2\text{BC-d}$, NLIVES C33/3 und LCES oH BC-d bzw. DEAE III. Auseinanderdriften der Doppellinien gegenüber LCES BC-a mit deutlicher Spornbildung.

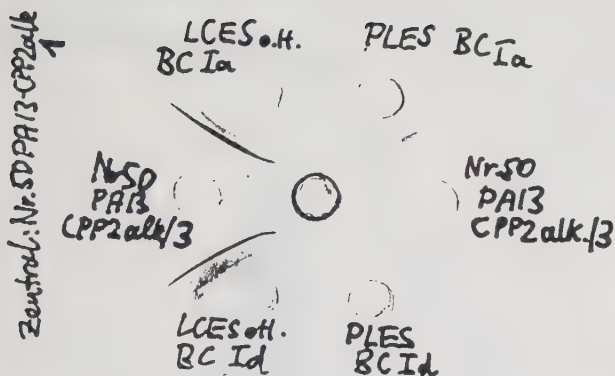


Abb. 54

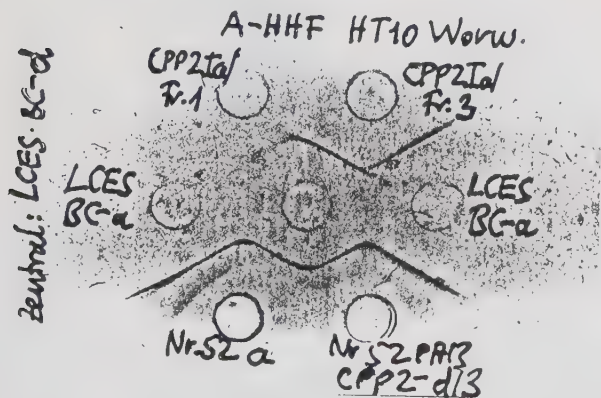


Abb. 55

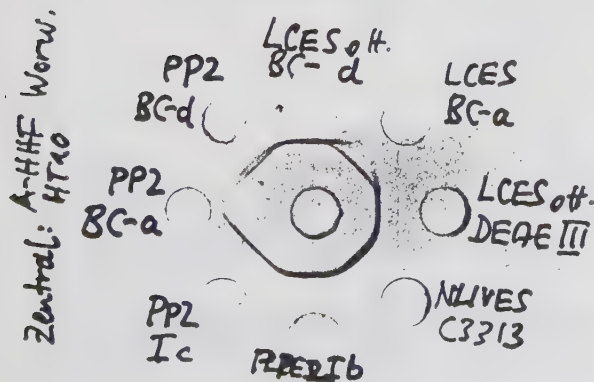


Abb. 56

¹²⁵JOD - MARKIERUNG VON FERRITIN (CHLORAMIN-T-METHODE)

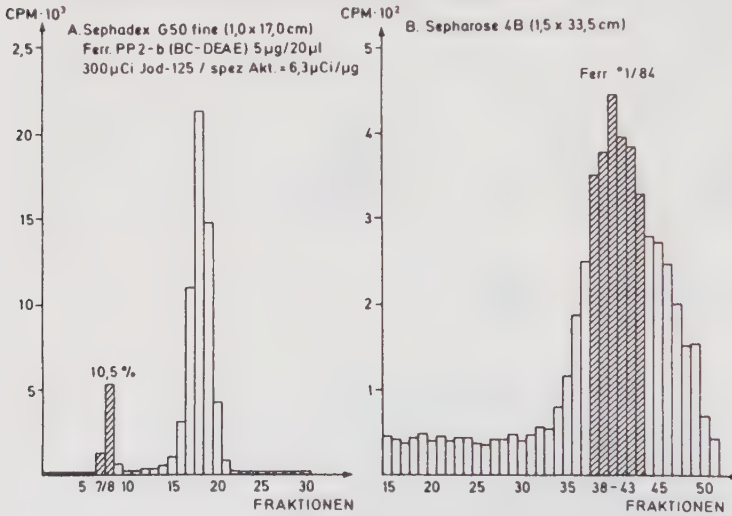


Abb. 57

¹²⁵J-MARKIERUNG VON FERRITIN (BOLTON-HUNTER-METHODE)

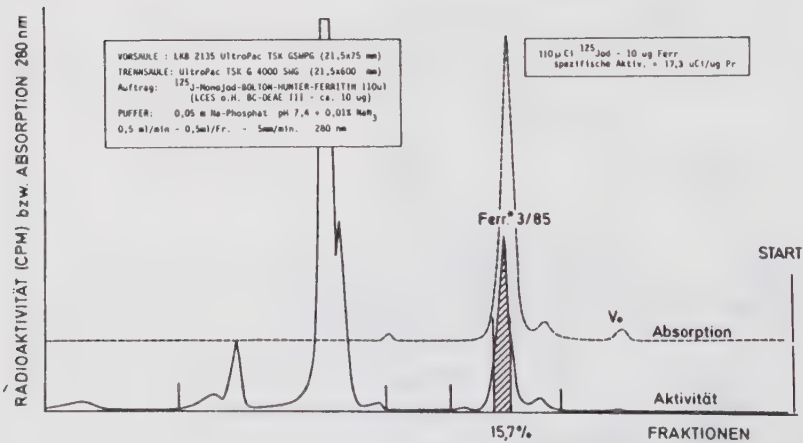


Abb. 58

FERRITIN-RADIOIMMUNOASSAY / ANTIKÖRPER-VERDÜNNUNGSKURVEN

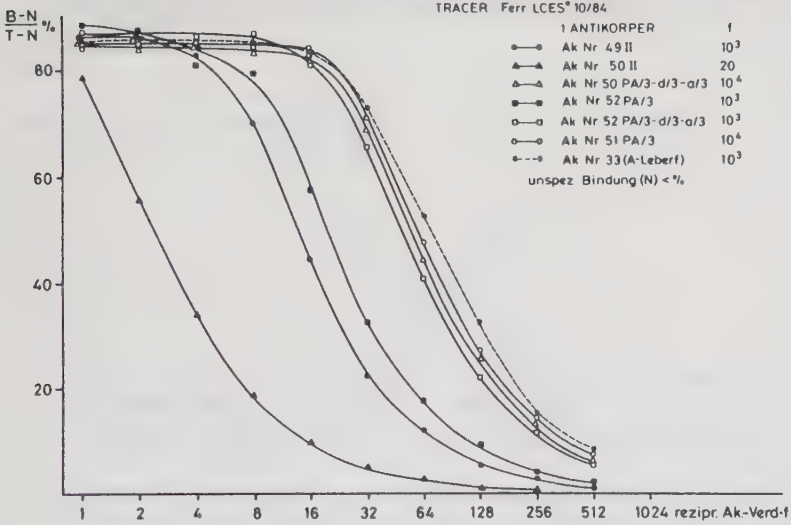


Abb. 59

FERRITIN - RADIOIMMUNOASSAY / STANDARD - INHIBITIONSKURVE

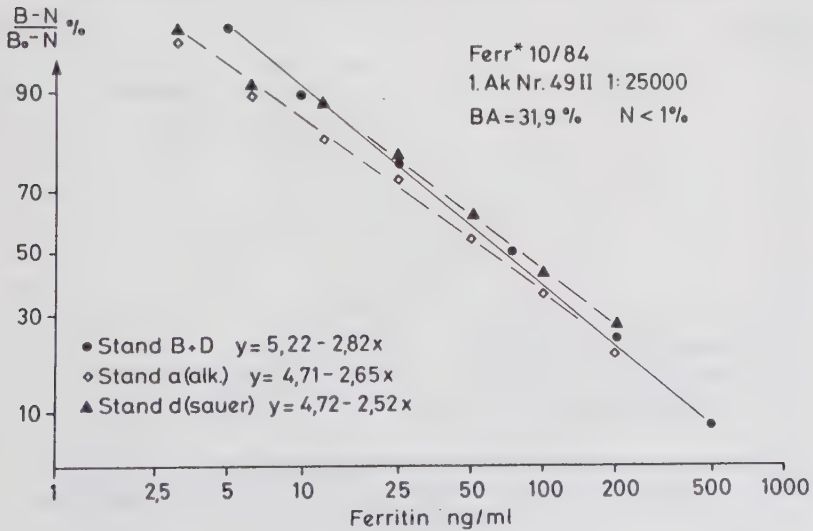


Abb. 60

FERRITIN - RADIOIMMUNOASSAY / STANDARD - INHIBITIONSKURVE

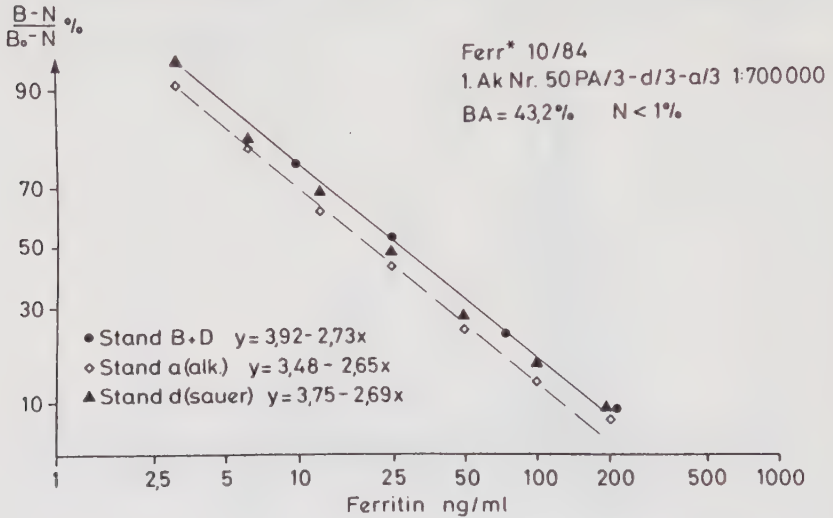


Abb. 61

FERRITIN - RADIOIMMUNOASSAY / STANDARD - INHIBITIONSKURVE

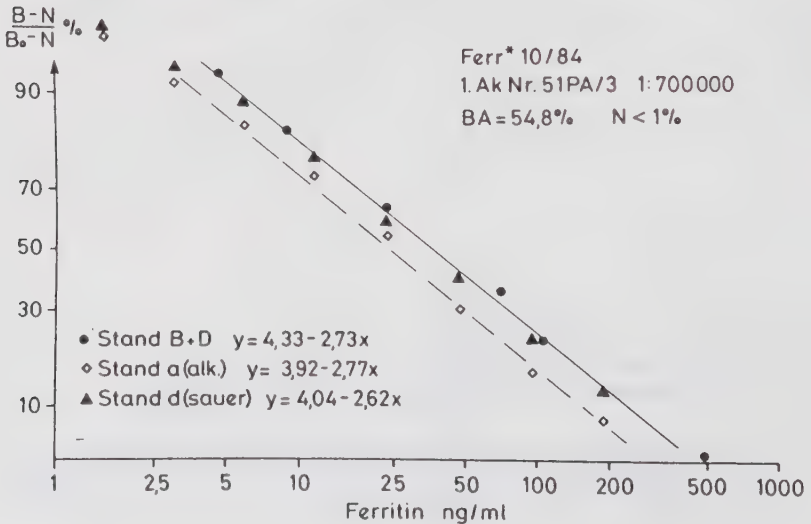


Abb. 62

FERRITIN - RADIOIMMUNOASSAY / STANDARD - INHIBITIONSKURVE

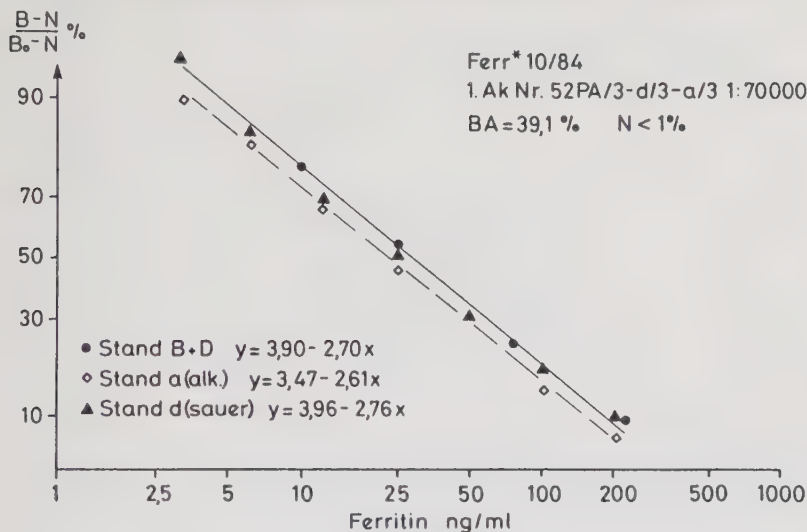


Abb. 63

FERRITIN - RADIOIMMUNOASSAY / STANDARD - INHIBITIONSKURVE

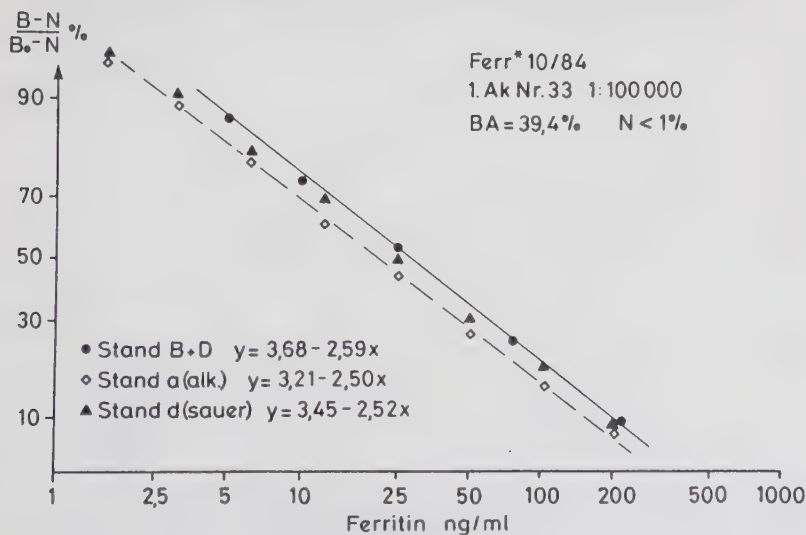


Abb. 64

FERRITIN - RADIOIMMUNOASSAY
SCATCHARD - PLOT von Anti-Ferr. IgG Nr.52
d/3 d/3

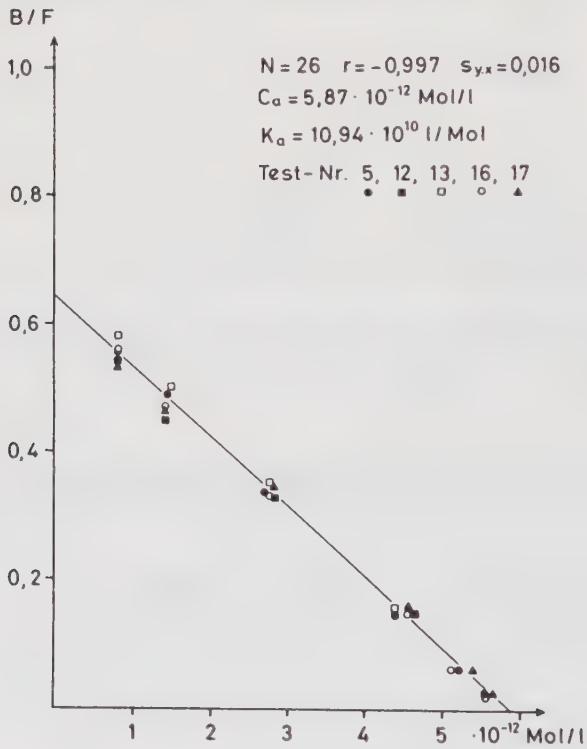


Abb. 65

FERRITIN-RIA LOGIT-LOG-AUSWERTUNG VON 19 TESTS

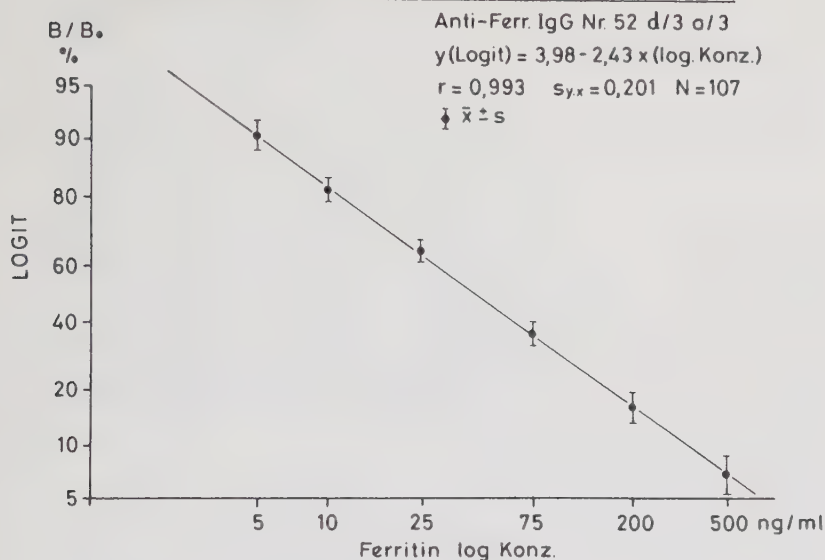


Abb. 66

SERUM-FERRITIN-BESTIMMUNGEN BEI NORMALPERSONEN UND PATIENTEN MIT LEBERZIRRHOSE SOWIE VERSCHIEDENEN MALIGEN ERKRANKUNGEN

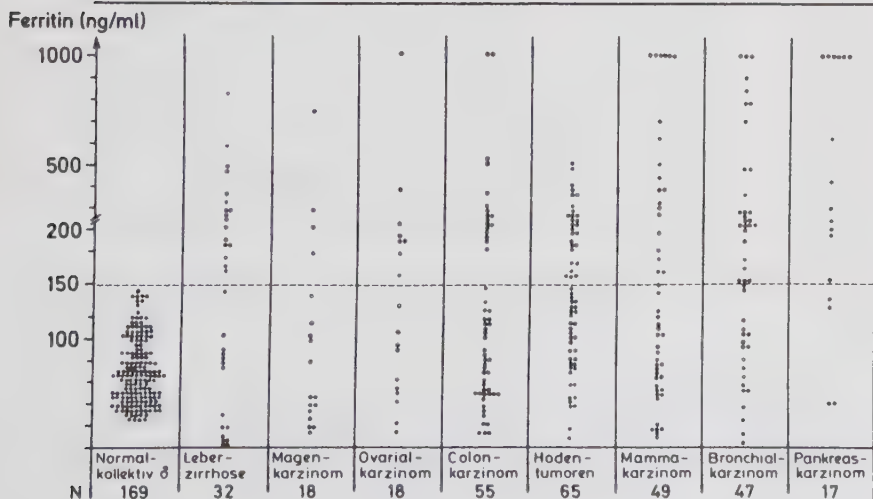


Abb. 67

2.2.5.2 Tabellen

Pipettier-Schemata (µl)

Antikörperverdünnungsreihe

Substanz	Total	N	AK-Probe
P.+30% PS	-	200	200
P.ohne PS	-	200	100
1. Antik.	-	-	100
Ferritin*	100	100	100
1. Inkubation, R.T., 16-24 H			
2. Antik.	-	100	100
2. Inkubation, R.T., 16-24 H			
Zentrifugation, R.T., 1000G, 45'			

Ferritin - Radioimmunoassay

Substanz	Total	N	A(0)	Stand.	Probe
P.+30% PS	-	200	200	200	-
P.ohne PS	-	200	-	-	200
Standard	-	-	100	100	-
Probe	-	-	-	-	100
1. Antik.	-	-	100	100	100
Ferritin*	100	100	100	100	100
1. Inkubation, R.T., 16-24 H					
2. Antik.	-	100	100	100	100
2. Inkubation, R.T., 16-24 H					
Zentrifugation, R.T., 1000G, 45'					

Tabelle 9

Übersicht über eigene Anti-Ferritin-Seren vom Kaninchen

Nr.	Immunisierungs- substanz	Anti- Serum (ml)	Absorption	Beurteilung
48	pp ₂	52	2mg NS/ml As.	sehr gutes As
49	pp ₂ a	44	"	sehr gutes As
50	pp ₂ d	46	"	gutes As
51	LCES oH a	53	"	sehr gutes As
52	LCES oH d	64	"	sehr gutes As

pp₂ = Plazentaprotein 2 (=Ferritin)

a = alkalisch

d = sauer

oH = ohne Hitzefällung

Tabelle 10

Ferritin - Radioimmunoassay

Vergleich verschiedener Ferritin - Antisera, Ferritin - Standards und Kontrollseren unter Verwendung eines Tracers (LCES oH 68II C33/3 8C 10/84, N = 0,8%)

Logit - Log - Auswertung

Antiserum	Verdünnung	BA(%)	Standard	50%-Punkt	N	r	$s_{y \cdot x}$	A	B	K-1	K-2	K-3	K-4
33 (Leber)	1:100.000	39,4	B+D	26,1	5	-0,999	0,048	3,676	-2,595	34,5	168,3	44,1	42,8
			pp _{2a}	19,2	8	-0,999	0,083	3,211	-2,504	25,6	132,2	33,0	32,0
			pp _{2d}	23,6	7	-0,999	0,049	3,454	-2,516	31,4	161,1	40,5	39,3
49II	1: 25.000	31,9	B+D	70,9	6	-0,999	0,071	5,218	-2,819	30,9	130,4	35,5	37,8
			pp _{2a}	59,8	4	-0,999	0,018	4,705	-2,648	24,7	114,4	28,7	30,7
			pp _{2d}	78,7	5	-0,999	0,033	4,776	-2,519	31,1	155,7	36,3	39,0
50 PA/3 -d/3-a/3	1:700.000	43,2	B+D	27,3	5	-0,999	0,051	3,923	-2,732	31,1	149,9	41,6	33,5
			pp _{2a}	20,4	8	-0,998	0,139	3,478	-2,654	23,4	115,3	31,5	25,2
			pp _{2d}	24,8	7	-0,997	0,138	3,750	-2,690	28,3	136,7	38,0	30,5
51 PA/3	1:700.000	54,8	B+D	38,6	6	-0,999	0,051	4,327	-2,728	32,1	187,7	45,1	40,1
			pp _{2a}	26,0	7	-0,998	0,112	3,916	-2,767	21,7	123,7	30,4	27,0
			pp _{2d}	34,9	7	-0,998	0,114	4,041	-2,620	28,8	181,1	41,1	36,3
52 PA/3 -d/3-a/3	1:70.000	39,1	B+D	27,9	5	-0,999	0,059	3,897	-2,697	26,2	146,2	40,4	37,4
			pp _{2a}	21,4	7	-0,997	0,118	3,468	-2,607	20,1	118,8	31,4	29,0
			pp _{2d}	27,3	8	-0,998	0,133	3,962	-2,760	25,7	137,7	39,2	36,4

Kontrollseren: K-1 = Normalserum

K-2 = Patientenserum bei Leberzirrhose

K-3 = Patientenserum bei Bronchialkarzinom

K-4 = Patientenserum bei Bronchialkarzinom

Tabelle 11

Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der Logit-Log-Standardgeraden-Parameter A und B und Kontrollserumwerte K1-K4 in Abhängigkeit verschiedener Anti-Ferritin-Antisera bzw. Standards unter Verwendung eines einheitlichen Tracers (Lungenkarzinom-Ferritin LCES* 10/84)

Antiserum/Standard		A	B	K-1	K-2	K-3	K-4
Nr. 33 (Ges. Leber)	N	3	3	3	3	3	3
	$\bar{x}$	3,477	-2,537	30,5	153,9	39,2	38,0
	s	0,233	0,051	4,5	19,1	5,7	5,5
	VK	6,7%	2,0%	14,8%	12,4%	14,4%	14,5%
Nr. 49II (A-Plaz. Ferr.alk.)	N	3	3	3	3	3	3
	$\bar{x}$	4,900	-2,662	28,9	133,5	33,5	35,8
	s	0,278	0,151	3,6	20,8	4,2	4,5
	VK	5,7%	5,7%	12,6%	15,6%	12,5%	12,5%
Nr. 50PA/3 -d/3-a/3 (A-Plaz.- Ferr.sauer)	N	3	3	3	3	3	3
	$\bar{x}$	3,717	-2,692	27,6	133,0	37,0	29,7
	s	0,224	0,039	3,9	16,1	5,1	4,2
	VK	6,0%	1,4%	14,1%	12,1%	13,8%	14,1%
Nr. 51PA/3 (A-LCES oH alkal.)	N	3	3	3	3	3	3
	$\bar{x}$	4,095	-2,705	27,5	164,2	38,9	34,5
	s	0,211	0,076	5,3	35,2	7,6	6,7
	VK	5,1%	2,8%	19,3%	21,4%	19,6%	19,6%
Nr. 52PA/3 -d/3-a/3 (A-LCES oH sauer)	N	3	3	3	3	3	3
	$\bar{x}$	3,776	-2,688	24,0	134,2	37,0	34,3
	s	0,268	0,077	3,4	14,0	4,9	4,6
	VK	7,1%	2,9%	14,1%	10,4%	13,2%	13,4%
Stand B&D	N	5	5	5	5	5	5
	$\bar{x}$	4,208	-2,714	31,0	155,9	41,3	38,3
	s	0,611	0,081	3,0	22,3	3,8	3,4
	VK	14,5%	3,0%	9,8%	14,3%	9,1%	9,0%
Stand. PP2a	N	5	5	5	5	5	5
	$\bar{x}$	3,756	-2,635	23,1	120,9	31,0	28,8
	s	0,588	0,096	2,2	7,3	1,6	2,7
	VK	15,7%	3,6%	9,6%	6,0%	5,1%	9,5%
Stand. PP2d	N	5	5	5	5	5	5
	$\bar{x}$	4,000	-2,621	29,1	154,5	39,0	36,3
	s	0,491	0,107	2,3	18,4	1,9	3,5
	VK	12,3%	4,1%	8,0%	11,9%	5,0%	9,7%
Signf. B&D PP2a PP2d	NS	NS	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001
	NS	NS	<0,002	<0,01	<0,001	<0,005	

Tabelle 12

Mittelwerte, Streuungen und Variationskoeffizienten der Standard-Bindungsaktivitäten (B/B %) von 19 Ferritin-Radioimmunoassays

(1. Antikörper: Nr.52 d/3-a/3 1:70.000; 2.Ak:v.d.Ziege 1:15 Stand. B/D)

Standard/0	5	10	25	75	200	500	ng/ml
N	19	17	18	19	18	17	18
$\bar{x}$	39,5	90,4	81,7	65,1	36,6	16,4	7,0
s	2,3	1,8	2,3	3,4	3,9	19,6	25,1
VK	5,8%	2,0%	2,8%	5,2%	10,6%	19,6%	25,1%

Tabelle 13

Mittelwerte, Streuungen und Variationskoeffizienten der wichtigsten Parameter der Logit-Log-Auswertungen von 19 Ferritin-Radioimmunoassay-Testen

(1. Antikörper Nr. 52 d/3-a/3 1:70.000; 2.Ak:v.d.Ziege 1:15 Stand. B+D 5-6)

	BA%	50%-Punkt ng/ml	r	$s_{y \cdot x}$	A	B	K1	K2	K3
N	19	19	19	19	19	19	13	19	19
$\bar{x}$	39,6%	44,2	-0,9993	0,063	3,99	-2,44	30,9	123,8	62,2
s	2,3	17,9	0,0007	0,039	0,22	0,12	3,3	10,4	6,6
VK	5,7%	17,9%		61,4%	5,5%	5,0%	10,7%	8,4%	10,6%

Tabelle 14

Serum-Ferritinpiegel bei Patienten mit Leberzirrhose und mit verschiedenen malignen Erkrankungen im Vergleich zu einem männlichen Normalkollektiv

	Normalkol- lektiv	Magen- Ca	Leber- zirrhose	*Ovarial- Ca	*Colon- Ca	maligne Hodentumore	Mamma- Ca	Bronchial- Ca	Pankreas- Ca	
N	169	18	32	18	55	63	49	47	17	N=468
10. PZ	32,5	10,0	19,4	28,3	22,1	45,0	28,8	39,2	53,1	
$\bar{x}$	70,3±29,4	124,6	194,2	207,5	173,1	165,0	447,7	388,3	985,3	
s	66,1	50,0	154,2	112,5	98,3	139,1	144,1	195,8	312,5	
90. PZ	113,9	260,0	395,0	215,0	283,8	335,0	1820,0	893,8	2825,0	
% < 200	100,0	83,3	65,6	83,3	76,4	74,6	69,5	53,2	35,3	
% < 500	0	11,1	28,1	11,1	16,4	23,8	12,2	29,8	23,5	
% < 1000	0	5,6	6,3	0	3,6	1,6	6,1	10,6	5,9	
% < 1000	0	0	0	5,6	3,6	0	12,2	6,4	35,3	

Normalkoll.	-	n.s.	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,001	p < 0,001
Magen-Ca		-	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,02	p < 0,05	p < 0,005	p < 0,001
Leberzirrh.			-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,01
Ovarial-Ca				-	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,01
Colon-Ca					-	n.s.	n.s.	0,005	p < 0,001
Hodentum.						-	n.s.	n.s.	p < 0,002
Mamma-Ca							-	n.s.	p < 0,02
Bronchial-Ca								-	p < 0,01

n.s. = "nicht signifikant"

Bei den mit * gekennzeichneten Kollektiven wurde zur Bestimmung von Median und 90. Perzentil jeweils ein Extremwert ausgeklammert.

Tabelle 15

Immunisierungsschemata zur Herstellung von Anti-Ferritin-Seren

Autor, Jahr (Ref.)	Spez.	Immunis.- Agens	Immunis.-Menge Appl.-Ort	kFA	Booster- Inj. nach	Immunis.- Dauer	Absorption
AROSIO et al. 1981 (12)	K	Leber-Ferr.	50ug multipel	+	3 Mo.: 20ug +iFA	3 Mo.	
	M	HeLa-Ferr.	20ug intra- peritoneal	+	1 Mo.: 5ug +iFA?	1 Mo.	
DEPPE et al. 1978 (73)	K	Milz-Ferr.	50ug s.c.	+gl.V.	alle 3 Wo.: 50ug+iFA s.c.	3 Mo.	
JONES und WORMOOD 1977 (146)	K	Milz-Ferr.	1mg i.m.	+	alle 2 Wo.: 1mg+kFA	6 Wo.	
	K	Herz-Ferr.	0,5mg i.m.	+	alle 2 Wo.: 0,5mg+kFA	6 Wo.	
JONES et al. 1980 (147)	MS	HeLa-Ferr.	25ug s.c. multipel	+	2 Mo.: 25ug +iFA 1 Mo.: 25ug +iFA s.c. multipel	14 Wo.	
LAMERZ et al. 1979 (171)	K	Lungen-Ca- Extrakt	10mg i.d. Fußsohlen	+gl.V.	mehrfach über 7-8 Wo.+iFA	10 Wo.	Normal-Serum AB-Erythr. Normal-Lungen- Extrakt
MARCUS und ZINBERG 1974 (189)	K	Mamma-Ca- Leber-Meta- Extrakt	50-100ug, 1ml; 0,2ml i.2 Fuss. 0,8ml multipel s.c. +0,5ml Pertussis Vakzine	+			Lyo. Hum.- Milch Plasma Leber
MAGSTAFF et al. 1980 (283)	K	Leukoz.-Ferr.	100ug, 250ul s.c. multipel	+gl.V.	8 Wo.: 100ug, 250ul + iFA	9 Wo.	
BULLOCK et al. 1979 (53)	K	Leber-Ferr.	1mg i.v.	+gl.V.	wöchentlich (ohne FA)		
	K	Leberzell- Ca-Ferr.	" "	"	"		
GUILLEUX und WAGNER 1981 (111)	K	Milz-Ferr.	50ug	+	8 Tagen: 50ug dann monatl. 50ug		
YODA und ABE 1980 (295)	K	Leukoz.-Ferr.	100ug, 1ml	+gl.V.	2 Wo.: +kFA 2 Wo.: ohne kFA	5 Wo.	
HALLIDAY et al. 1976 (113)	K	Leber-Ferr.	1mg i.m.	+gl.V.	1 Wo.: 1mg 1 Wo.: 1mg		
GHIEMI et al. 1982 (99)	K	Leber-Ferr.	2x30ug i.c. +iFA				
BROWN et al. 1979 (46)	K	Leber-Ferr.	1mg, 1ml i.m. alle 10 Tage für 40 Tage	Ø		50Tage	
OUVIST et al. 1980 (244)	K	Milz-Ferr.	0,5mg i.m.	+gl.V.	monatlich +iFA		
Eigene Untersuchungen 1982-1984	K	<u>Plaz.-Ferr.</u> PP2 PP2a PP2d <u>Lu.-Ca.-Ferr.</u> LCESa LCESd	500ug: s.c.i.d.Fuss. Rest i.m. (s.Text)	+gl.V.	1 Wo.: gleiche Menge + iFA 3 Wo.: mehr- mals i.v. (s.Text)	7-8 Wo.	2mg/ml Lyo. Normalserum (PP2a) (PP2d)

K=Kaninchen M=Maus MS=Meerschweinchen

Tabelle 16

Angaben zur Jod-Markierung des Ferritins nach der Chloramin T-Methode

Autor, Jahr (Ref.)	Jod ¹²⁵ mCi	Ferritin µg	Chl. I µg	Na ₂ S ₂ O ₅ µg	Puffer	R. Vol. 0. Na ₂ S ₂ O ₅	R. Zeit	Reinigung	spez. Aktiv. µCi/µg
DEPPE et al. 1978 (73)	1	10 (Milz)	15	100 (+KJ)	Phosph. P. 0,5M, pH 7,4	100 µl	30" RT	Sephadex G75 bzw. Sepharose 6B	
HAZARD et al. 1977 (123)	1	10 (Leber) 10 (HeLa)	20 10	100 100	Phosph. P. 0,5M, pH 7,5	100	60" RT 60" 0°C	Sephadex G25 "	
LUXTON et al. 1977 (184)	1	6 (Leber)	20	60 (+KJ)	Phosph. P. 0,4M, pH 7,4	40 µl	30" RT	Sephadex G25	
MARCUS und ZINBERG 1975 (190)	1	12-25 (Mamma- Ca)	20	100	Phosph. P. 0,5M, pH 7,5	80 µl	60" RT	Sephadex G25	
GHIEMI et al. 1982 (99)	2	100 (Leber)	75	800	Phosph. P. 0,5M, pH 7,5	120 µl	30" RT	Sepharose 6B	10
PORTER 1974 (239)	0,5	2000 (Milz)	200	200	Tris-HCl P. 0,005M, pH 7,0	4 ml	4min. RT	Dialyse (0,9% NaCl)	0,01
eigene Prä- paration	0,3 (-0,45)	5 (Plazenta)	50	12	Phosph. P. 0,5M, pH 7,5	70 µl	25-40"	Sephadex G50 fine Sepharose 6B	6,3

Tabelle 17

3. Z U S A M M E N F A S S U N G

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wird eine ausführliche Übersicht über physico-chemische Eigenschaften, Funktion, Vorkommen, Präparation und Messung der menschlichen Ferritine gegeben. Dabei wird in besonderer Weise auf die klinische Bedeutung der Ferritinbestimmung bei benignen und verschiedenen malignen Erkrankungen eingegangen.

Im folgenden Teil wird die Entwicklung eines protein-schonenden Isolierungsverfahrens von Ferritin aus Geweben beschrieben. Gesamtferritin wurde aus gepoolten reifen Plazenten (12,5 kg) sowie aus operativ gewonnenen gepoolten Bronchialkarzinomen (überwiegend Plattenepithelkarzinome, 1,5 kg) durch mechanische Zerkleinerung (Virtis-Homogenisator, Potter) und saline Extraktion mit (Plazenta) und ohne Hitzefällung (Bronchialkarzinom) sowie anschließende Zentrifugation (36.000g; 60min; 4°C; Ferritin im Überstand) und Konzentration gewonnen. Die weitere Isolierung erfolgte durch Gelfiltration (Sephrose 6B), Immunaффinitätschromatographie (CNBr.aktiv. Sepharose 4B mit angekoppeltem Anti-Ferritin-IgG v. Kan.) und abschließende hochauflösende HPLC-Gelpermeationschromatographie (TSK-G 4000 SW).

Das so gewonnene Plazenta (PLES)- bzw. Lungenkarzinom (LCES)-Gesamtferritin wurde mittels hochauflösender HPLC-Anionenaustauscher-Chromatographie (TSK 545 DEAE) in je eine saure und alkalische und zwei intermediäre Fraktionen aufgetrennt. Mit den jeweils sauren und alkalischen Anteilen von Plazenta- und Lungenkarzinom-Ferritin sowie mit Plazenta-Gesamtferritin wurden fünf Kaninchen immunisiert und die IgG-Gesamtfraktionen der erhaltenen hochtitrigen polyclonalen Antiseren nach Absorption (Normalserum) durch Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose CL-4B gewonnen. Ferner wurden mit einem Teil der sauren bzw. alkalischen Plazenta-Ferritin-Präparationen (2-5mg) Immanab/adsorptionssäulen durch ihre Bindung an CNBr.aktiv. Sepharose 4B sowie auch entsprechende Standards hergestellt. An diesen Immunsäulen wurden

die erhaltenen vier Antiserum-IgG-Fraktionen gegen saure bzw. alkalische Plazenta- bzw. Lungenkarzinom-Ferritine kreuzweise und repetitiv absorbiert und jeweils die bindenden und nicht-bindenden Fraktionen getrennt gesammelt, auf ihre Ausgangsmenge konzentriert und in der Immunodiffusion auf ihre verbliebene Reaktivität geprüft.

Durch diese Ab/Ad-sorptionsversuche konnte gezeigt werden, daß sowohl die nativen Antiseren (bzw. deren IgG-Fraktionen) als auch die kreuzweise und repetitiv ab- und adsorbierten Fraktionen (spezifische Anti-Ferritin-IgG-Fraktionen) in der Immunodiffusion als auch im Radioimmunoassay keinen signifikant sicheren Anhalt für eine spezifischere Trennung von Antikörperpopulationen gegen saure oder alkalische Isoferritine aufwiesen. Ebenso war es nicht möglich, eine immunologische Unterscheidbarkeit zwischen Plazenta- und Lungenkarzinom-Ferritinen mit diesen hochtitrigen und ferritin-spezifischen Antiseren nachzuweisen. In der Immunodiffusion konnte lediglich mittels eines polyklonalen Referenz-Antiserums gegen menschliches Herz-Gesamtferritin durch angedeutete Spornbildung ein Hinweis auf einen immunologischen Unterschied zwischen sauren und alkalischen Ferritin-Präparationen aus Lungenkarzinom gewonnen werden.

Mit hochgereinigtem spezifischen Anti-Ferritin-IgG gegen saure Lungenkarzinom-Ferritin-Anteile (Nr-52 Pr. A/3-d/3-a/3) und HPLC-gereinigtem Lungenkarzinom-Gesamtferritin wurde ein kompetitiver Doppelantikörper-Radioimmunoassay entwickelt. Für die radioaktive Markierung (^{125}J) des Ferritins erwies sich die BOLTON-HUNTER-Methode (mit N-Succinimidyl-3-(4-hydroxy-5- ^{125}J)jodophenyl)-propionat) im Gegensatz zur Chloramin T-Methode als schonender und reproduzierbarer (spez. Aktivität $17,3 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). Die radioimmunologische Prüfung der oben beschriebenen verschiedenen Anti-Ferritin-IgG-Fraktionen im Ansatz mit einem kommerziellen Referenz-Leberferritin-Standard sowie eigenen Standards aus sauren und alkalischen Plazenta-Ferritinen ergab keine signifikanten Unterschiede in bezug auf Bindungs- und Verdrängungsverhalten. Für

den Ferritin-Radioimmunoassay wurde die spezifische Anti-Ferritin-Präparation gegen saures Lungenkarzinom-Ferritin (Nr. 52 PA/3-d/3-a/3) verwandt (Arbeitsverdünnung 1:70.000 bis 1:100.000), mit dem reproduzierbaren linearen Standardgeraden (kommerz. Leberferritin-Standard) bei der logit-log-Auswertung in einem weiten Meßbereich von 5-500 ng/ml erhalten wurden. $y(\text{Logit}) = 3,98 - 2,43 \times (\log. \text{Konz.})$. Mit diesem Radioimmunoassay wurden Serumbestimmungen in einem Normalkollektiv männlicher Probanden (N=259) und bei 299 Patienten mit Leberzirrhose und verschiedenen malignen Erkrankungen durchgeführt. Gegenüber dem Normalkollektiv mit einer oberen Normgrenze von 150 ng/ml ergaben sich die höchsten Sensitivitätsraten pathologischer Ferritinspiegel beim Pankreaskarzinom (76,5%), Bronchialkarzinom (61,7%), Ovarialkarzinom (44,4%) und Keimzelltumoren des Hodens (44,4%). Niedriger lagen die Raten beim Mamma- (40,8%), Colon- (30,9%) und Magenkarzinom (22,2%). Demgegenüber fand sich eine relativ hohe Sensitivität von 53,1% bei Patienten mit Leberzirrhose, so daß mit dem entwickelten Radioimmunoassay wie mit anderen kommerziellen Ferritin-Testen die Spezifität für maligne Erkrankungen und gegenüber benignen Erkrankungen stark reduziert bzw. aufgehoben ist.

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit werden die erhaltenen Ergebnisse mit den Befunden anderer Untersuchungsgruppen verglichen und kritisch analysiert. Aus den eigenen und Fremduntersuchungen wird gefolgert, daß die klinische Bedeutung von Ferritin als Tumormarker trotz der hohen Sensitivität für verschiedene maligne Erkrankungen wegen der geringen Spezifität gegenüber benignen Erkrankungen deutlich eingeschränkt ist und sich sein Einsatz hauptsächlich für die Therapie- und Verlaufsbeurteilung und nur unter Berücksichtigung möglicher anderer Ursachen für seine Erhöhung im Serum eignet.

4. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ADDISON, G.M., M.R. BEAMISH, C.N. HALES, M. HODKINS, A. JACOBS, P. LLEWELLIN:
An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and overload.
J. Clin. Pathol. 39: 326 (1972)
2. ÁDDISON, J.M., J.E. FITTON, W.G. LEWIS, K. MAY, P.M. HARRISON:
The amino acid sequence of human liver apoferritin.
Febs letters 164 (1): 139 (1983)
3. ADELMAN, T.G. and J. DRYSDALE:
Synthesis of ferritin subunits by free and membrane bound ribosomes.
In: BROWN, E.B., J. FIELDING, R.R. CRICHTON (Hrsg.), Proteins of iron metabolism, Grune & Stratton, New York, 1977. S. 49
4. AKAHONAI, Y., A. TAKAHASHI, A. YACHI, T. WADA:
Electrofocusing analysis of isoferritins.
In: FISHMAN, W.H., St. SELL (Hrsg.), Onco-Developmental Gene Expression, Acad. Press, N.Y., S. Franc., London 1976. S. 763
5. AKAHONAI, Y., A. YACHI, T. WADA:
Isoferritins: clinical application.
In: LEHMANN, F.G. (Hrsg.), Carcino-Embryonic Proteins, Vol. II, Elsevier/North-Holland, Biomed. Press, 1979. S. 441
6. ALI, F.M.K., A. MAY, B.M. JONES, A. JACOBS:
Enrichment of erythroblasts from human bone marrow using complement-mediated lysis: measurement of ferritin.
Brit. J. Haematol. 53: 227 (1983)
7. ALI, M.A., A.W. LUXTON, W.H. WALKER:
Serum ferritin concentration and bone marrow iron stores: a prospective study. CMA J. 118: 945, (1978)
8. ALPERT, E., D.S. SNYDER, L. DAVENPORT, A. QUARONI:
Human liver ferritin: Alterations in primary structure and antigenicity in a malignant liver cell line.
In: LEHMANN, F.G. (Hrsg.), Carcino-Embryonic Proteins, Vol. I, Elsevier/North-Holland Biomed. Press, 1979. S. 261
9. ARIOSIO, P., T.G. ADELMAN, J.W. DRYSDALE:
On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers.
J. Biol. Chem. 253: 4451 (1978)
10. AROSIO, P., T.G. ADELMAN, M. YOKOTA, J.W. DRYSDALE:
A comparative study of isoferitins in normal and malignant tissues.
In: FISHMANN, W.H., St. SELL (Hrsg.), Onco-Developmental Gene Expression Academ. Press Inc., N.Y., S. Franc., London 1976. S. 743

11. AROSIO, P., G. GATTI, M. BOLOGNESI:
Selective crystallization of horse isoferitins.
Biochim. Biophys. Acta 744 (2): 230 (1983)
12. AROSIO, P., C. IACOBELLO, E. MONTESORO, A. ALBERTINI:
Serum ferritin evaluation with radioimmunoassays specific
for Hela and liver ferritin types.
Immunology letters 3: 309 (1981)
13. AROSIO, P., M. YOKOTA, J.W. DRYSDALE:
Structural and immunological relationship of isoferitins
in normal and malignant cells.
Cancer Res. 36: 1735 (1976)
14. ASAKAWA, H. and W. MORI:
Possibly unique subunit(s) of human ferritins responsible
for tissue specificity.
Hoppe-Seyler's Ztschr. für Physiol. Chemie 364 (7): 859 (1983)
15. ASAKAWA, H., W. MORI, T. TAGUCHI:
Immunological heterogeneity in human ferritinemia.
Gann 67(3): 347 (1976)
16. AUNGST, C.W.:
Ferritin in body fluids.
J. Lab. Clin. Med. 71: 517 (1968)
17. BARTELS, U., N. STRANDBERG PEDERSEN, S. JARNUM:
Iron absorption and serum ferritin in chronic inflammatory
bowel disease.
Scand. J. Gastroent. 13: 649 (1978)
18. BATEY, R.G., S. HUSSEIN, S. SHERLOCK, A.V. HOFFBRAND:
The role of serum ferritin in the management of idiopathic
haemochromatosis.
Scand. J. Gastroent. 13: 953 (1978)
19. BEAUMONT, C., M. SIMON, R. FAUCHET, J.P. HESPEL, P. BRISSOT,
B. GENETET, M. BOUREL:
Serum ferritin as a possible marker of the hemochromatosis
allele.
N. Engl. J. Med. 301: 169 (1979)
20. BEAUMONT, C., M. SIMON, P.M. SMITH, M. WORWOOD:
Hepatic and serum ferritin concentrations in patients with
idiopathic hemochromatosis.
Gastroenterol. 79: 877 (1980)
21. BECHSTEIN, P.-B., J.P. KALTWASSER, K.M. MOCH, E. WERNER:
Die Bedeutung der Serumferritinbestimmung zur Ermittlung der
Eisenspeicher in der chronischen Niereninsuffizienz.
In: J.P. KALTWASSER, E. WERNER (Hrsg.), *Serumferritin*,
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980. S. 259

22. BELL, J.D., W.R. KINCAID, R.G. MORGAN, H. BUNCE, J.B. ALPERIN, H.E. SARLES, A.R. REMMERS:
Serum ferritin assay and bone-marrow iron stores in patients on maintenance hemodialysis.
Kidney Intern. 17 (No.2): 237 (1980)
23. BERNARD, A.M. and R.R. LAUWERYS:
Significance of hyperferritinuria.
Clin. Chem. 29(12): 2121 (1983)
24. BEZWODA, W.R., T.H. BOTHWELL, J.D. TORRANCE, A.P. MAC PHAIL, R.W. CHARLTON, G. KAY and J. LEVIN:
The relationship between marrow iron stores, plasma ferritin concentrations and iron absorption.
Scand. J. Haematol. 22: 113 (1979)
25. BIEBER, C.P. and M.M. BIEBER:
Detection of ferritin as a circulating tumor-associated antigen in Hodgkin's disease.
Natl. Cancer Inst. Monogr. 36: 147 (1973)
26. BIRGEGARD, G.:
Kontrolle der Eisenreserven von Blutspendern durch Serumferritinbestimmung.
In: J.P. KALTWASSER, E. WERNER (Hrsg.), Serumferritin, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980. S. 130
27. BIRGEGARD, G.:
The source of serum ferritin during infection. Studies with concanavalin A-sepharose absorption.
Clin. Sci. 59: 385 (1980)
28. BIRGEGARD, G.:
Serum ferritin: physiological and methodological studies.
Clin. Chim. Acta 103: 277 (1980)
29. BIRGEGARD, G., R. HÄLLGREN, A. KILLANDER, A. STRÜMBERG, P. VENGE, L. WIDE:
Serum ferritin during infection. A longitudinal study.
Scand. J. Haematol. 21: 333 (1978)
30. BIRGEGARD, G., R. HÄLLGREN, A. KILLANDER, P. VENGE, L. WIDE:
Serum ferritin during infection.
Acta Med. Scand. 205: 641 (1979)
31. BIRGEGARD, G., R. HÄLLGREN, P. VENGE, L. WIDE:
Serum ferritin during inflammation. A study on myocardial infarction.
Acta Med. Scand. 206: 361 (1979)
32. BLAKE, D.R., P.A. BACON:
Serum ferritin and rheumatoid disease.
Brit. Med. J. 282: 1273 (1981)

33. BLIGHT, G.D. and B.H. MORGAN:
Ferritin and iron uptake by reticulocytes.
Brit. J. Haematol. 55(1): 59 (1983)
34. BLUMBERG, A.B., H.R. MARTI, C.G. GRABER:
Serum ferritin and bone marrow iron in patients undergoing
continuous ambulatory peritoneal dialysis.
JAMA 250 (24): 3317 (1983)
35. BOLARIN, D.M.:
Serum ferritin in Nigerian patients with Burkitt's lymphoma
and other malignant diseases.
Acta Trop. 40: 71 (1983)
36. BOLOGNESI, M., G. GATTI, S. LEVI, E. GABRI, P. AROSIO:
Crystallographic data for horse heart ferritin.
Febs letters 165(1): 63 (1984)
37. BOLTON, A.E. and W.M. HUNTER:
The labelling of proteins to high specific radioactivities
by conjugation to a ^{125}I -containing acylating agent. Appli-
cation to the radioimmunoassay.
Biochem. J. 133: 529 (1973)
38. BOLTON, A.E., N. LEE-OWN, R. KRAMER McLEAN, G.S. CHALLAND:
Three different radioiodination methods for human spleen
ferritin compared.
Clin. Chem. 25: 1826 (1979)
39. BOYER, R.F., B.E. SCHORI:
The incorporation of iron into apoferritin as mediated by
ceruloplasmin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 116(1): 244 (1983)
40. BRADFORD, M.M.:
A rapid and sensitive method for the quantitation of micro-
gram quantities of protein utilizing the principle of pro-
tein-dye binding.
Analyt. Biochem. 72: 248 (1976)
41. BRATLID, D. and P.J. MOE:
Hemoglobin and serum ferritin levels in mothers and infants
at birth.
Eur. J. Pediat. 134: 125 (1980)
42. BREDENKAMP, B.L. and S.M. JOUBERT:
The effect of ampholytes on ferritin isoelectric focussing
patterns.
J. Chromatogr. 230: 327 (1982)
43. BRETSCHER, M.S. and J.N. THOMSON:
Distribution of ferritin receptors and coated pits on giant
HeLa cells.
The EMBO J. 2(4): 599 (1983)

44. BROWN, A.J., E.A. LEIBOLD, H.N. MUNRO:
Isolation of cDNA clones for the light subunits of rat liver ferritin-evidence that the light subunit is encoded by a multigene family.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA BiolSci. 80: 1265 (1983)
45. BROWN, P.J., M.J. LEYLAND, J.P. KEENAN, P.D.G. DEAN:
Preparative electrophoretic desorption in the purification of human serum ferritin by immuno-adsorption.
Febs letters 83/2: 256 (1977)
46. BROWN, R.D., G.C. MEEHAN, H. ROBIN, H. KRONENBERG:
Immunoradiometric and electroimmuno assays of increased ferritin and apoferritin levels in serum.
Pathology 11: 59 (1979)
47. BROXMEYER, H.E.:
Acidic isoferritins and E-type prostaglandins in sources of colony stimulatory factors mask detection of cycling granulocyte-macrophage progenitor cells.
Blood 60: 1042 (1982)
48. BROXMEYER, H.E., J. BOGNACKI, P. RALPH, M.H. DÜRNER, L. LU, H. CASTRO-MALASPINA:
Monocyte-macrophage derived acidic isoferritins: normal feed-back regulators of granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro.
Blood 60: 595 (1982)
49. BRYCE, C.F.A. and R.R. CHRICHTON:
The subunit structure of horse spleen ferritin.
J. Biol. Chem. 246: 4198 (1971)
50. BRYCE, C.F., C.G. MAGNUSSON, R.R. CHRICHTON:
A reappraisal of the electrophoretic patterns obtained from ferritin and apoferritin in the presence of denaturants.
Febs letters 96: 257 (1978)
51. BUFFE, D. and C. RIMBAUT:
Alpha₂-H-globulin, a hepatic glycoferroprotein: characterization and clinical significance.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 259: 417 (1975)
52. BULLEN, J.J. and P.R. JOYCE:
Abolition of the bactericidal function of polymorphs by ferritin antiferritin complexes.
Immunology 46: 497 (1982)
53. BULLOCK, S., A. BOMFORD, R. WILLIAMS:
A biochemical comparison of normal human liver and hepatocellular carcinoma ferritins.
Biochem. J. 185: 639 (1980)
54. BURGER, E.C., H.J. ZYMAN, K. BAUER, F. GABL:
Zur Ferritinbestimmung im medizinischen Laboratorium.
Med. Labor 32(7): 165 (1979)

55. CARTWRIGHT, G.E.:
The anemia of chronic disorders.
Semin. Hematol. 3: 351 (1966)
56. CASKEY, J.H., C. JONES, Y.E. MILLER, P.A. SELIGMAN:
Human ferritin gene is assigned to chromosome-19.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80: 482 (1983)
57. CAVANNA, F., G. RUGGERI, C. IACOBELLO, G. CHIEREGATTI,
E. MARADOR, A. ALBERTINI, P. AROSIO:
Development of a monoclonal antibody against human heart
ferritin and its application in an immunoradiometric assay.
Clin. Chim. Acta 134 (3): 347 (1983)
58. CAZZOLA, M., P. AROSIO, G. BAROSI, G. BERGAMASCHI, L. DEZZA,
E. ASCARI:
Ferritin in the red cells of normal subjects and patients
with iron deficiency and iron overload.
Brit. J. Haemat. 53: 659 (1983)
59. CAZZOLA, M., P. AROSIO, P.G. GOBBI, G. BAROSI, G. BERGAMASCHI,
L. DEZZA, C. IACOBELLO, E. ASCARI:
Basic and acidic isoferritins in the serum of patients with
Hodgkins disease.
Europ. J. Cancer Clin. Oncol. 19: (3): 339 (1983)
60. CAZZOLA, M., G. BERGAMASCHI, L. DEZZA, G. BAROSI, E. ASCARI:
The origin of serum ferritin in acquired transfusional iron
overload in adults. Studies with concanavalin A-sepharose ab-
sorption.
Haematologica 67: 817 (1982)
61. CAZZOLA, M., C. BORGNA-PIGNATTI, P. de STEFANO, G. BERGAMASCHI,
I.G. BONGO, L. DEZZA, F. AVATO:
Internal distribution of excess iron and sources of serum
ferritin in patients with Thalassaemia.
Scand. J. Haematol. 30: 289 (1983)
62. CAZZOLA, M., L. DEZZA, G. BERGAMASCHI, G. BAROSI, V. BELLOTTI,
D. CALDERA, M.M. CIRIELLO, S. QUAGLINI, P. AROSIO, E. ASCARI:
Biologic and clinical significance of red cell ferritin.
Blood 62 (5): 1078 (1983)
63. CHAPMAN, R.W., A. GORMAN, LAULICHT, M.A. HUSSAIN, S. SHERLOCK,
A.V. HOFFBRAND:
Binding of serum ferritin to concanavalin-A in patients with
iron overload and with chronic liver disease.
J. Clin. Pathol. 35: 481. (1982)
64. CHEN, M. and R.R. CRICHTON:
Purification and characterisation of a bacterioferritin from
AZOTOBACTER chroococcum.
Biochim. Biophys. Acta 707: 1 (1982)
65. CHU, L.L.H. and R.A. FINEBERG:
On the mechanism of iron-induced synthesis of apoferritin in
HeLa cells.
J. Biol. Chem. 244: 3847 (1969)

66. CLAUSTRES, M., F. GUILLEUX, V. SIESO, H. BELLET, B. MAGNAN de BORNIER:
Study of human isoferritins from liver, spleen, heart and placenta by the microcomplement fixation technique.
Path. Biol. 30: 847 (1982)
67. COOK, J.D. and B.S. SKIKNE:
Serum ferritin: a possible model for the assessment of nutrient stores.
Amer. J. Clin. Nutr. 35: 1180 (1982)
68. CRAGG, S.J., A.M. COVELL, A. BURCH, G.M. OWEN, A. JACOBS, M. WORWOOD:
Turnover of ¹³¹I-human spleen ferritin in plasma.
Brit. J. Haematol. 55(1): 83 (1983)
69. CRAGG, S.J., M. WAGSTAFF and M. WORWOOD:
Detection of a glycosylated subunit in human serum ferritin.
Biochem. J. 199: 565 (1981)
70. CHRICHTON, R.R., F. ROMAN, F. ROLAND:
Iron mobilization from ferritin by chelating agents.
J. Inorganic Biochem. 13: 305 (1980)
71. DAVID, C.N. and K. EASTERBROOK:
Ferritin in the fungus *Phycomyces*.
J. Cell. Biol. 48: 15 (1971)
72. DAWKINS, S., I. CAVILL, C. RICKETTS, M. WORWOOD:
Variability of serum ferritin concentration in normal subjects.
Clin. lab. Haemat. 1: 41 (1979)
73. DEPPE, W.M., S.M. JOUBERT, P. NAIDOO:
Radioimmunoassay of serum ferritin.
J. Clin. Pathol. 31: 872 (1978)
74. DOCCI, D., F. TURCI, G. SALVI, L. CENCIOTTI, E. PISTOCCHI:
Serum ferritin in patients on maintenance hemodialysis.
Nephron 34(3): 201 (1983)
75. DÜRNER, M.H., U. ABEL, D. FRITZE, H.G. MANKE, P. DRINGS:
Serum ferritin in relation to the course of Hodgkin's disease.
Cancer 52 (12): 2308 (1983)
76. DREWS, J., J. DÜLLMANN, K. HAUSMANN, R. KUSE:
Die Serumferritinbestimmung in Diagnostik und Therapie der Eisenüberladung.
In: J.P. KALTWASSER, E. WERNER (Hrsg.), Serumferritin, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980. S. 194
77. DRYSDALE, J.W.:
Heterogeneity in tissue ferritins displayed by gel electro-focusing.
Biochem. J. 141: 627 (1974)

78. DRYSDALE, J.:
Ferritin in cancer: Biochemical perspectives.
In: LEHMANN, F.G. (Hrsg.), Carcino-Embryonic Proteins, Vol.I,
Elsevier/North-Holland Biomed. Press, 1979. S. 249
79. DRYSDALE, J.W. and H.N. MUNRO:
Small-scale isolation of ferritin for the assay of the
incorporation of ^{14}C -labelled amino acids.
Biochem. J. 95: 851 (1965)
80. DRYSDALE, J.W. and H.N. MUNRO:
Small-scale isolation of ferritin for the assay of the
incorporation of ^{14}C -labelled amino acids.
Biochem. J. 95: 851 (1965)
81. DRYSDALE, J.W. and H.N. MUNRO:
Regulation of synthesis and turnover of ferritin in rat
liver.
J. Biol. Chem. 241: 3630 (1966)
82. DRYSDALE, J.W. and D.A. SHAFRITZ:
In vitro stimulation of apoferritin synthesis by iron.
Biochim. Biophys. Acta 383: 97 (1975)
83. DRYSDALE, J.W. and R.M. SINGER:
Carcinofetal human isoferritins in placenta and HeLa cells.
Cancer Res. 34: 3352 (1974)
84. EIJK, van H.G., M.J. KROOS, G.A. HOOGENDOORN, H.C. WALLEN-
BURG:
Serum ferritin and iron stores during pregnancy.
Clin. Chim. Acta 83: 81 (1978)
85. ENTMAN, S.S., L.D. RICHARDSON, A.P. KILLAM:
Elevated serum ferritin in the altered ferrokinetics of
toxemia of pregnancy.
Amer. J. Obstet. Gynecol. 144: 418 (1982)
86. ESCHBACH, J.W., J.D. COOK, B.H. SCRIBNER, C.A. FINCH:
Iron balance in hemodialysis patients.
Ann. Internal Med. 87: 710 (1977)
87. FAGARD, R., R. SADDI:
Ferritin structure and biosynthesis.
Biochimie 59: 765 (1977)
88. FEDER, J., I. GIAEVER:
Adsorption of ferritin.
J. Colloid Interface Sci. 78: 144 (1980)
89. FINCH, C.A., J.D. COOK, R.F. LABBE, M. CULALA:
Effect of blood donation on iron stores as evaluated by
serum ferritin.
Blood 50: 441 (1977)

90. FINEBERG, R.A. and D.M. GREENBERG:
Ferritin biosynthesis.
II. Acceleration of synthesis by the administration of iron.
J. Biol. Chem. 214: 97 (1955)
91. FINEBERG, R.A. and D.M. GREENBERG:
Ferritin biosynthesis.
III. Apoferritin, the initial product.
J. Biol. Chem. 214: 107 (1955)
92. FISHBACH, F.A., D.W. GREGORY, P.M. HARRISON, T.G. HOY,
J.M. WILLIAMS:
On the structure of hemosiderin and its relationship to
ferritin.
J. Ultrastruct. Res. 37: 495 (1971)
93. FORMAN, D.T. and M.V. VYE:
Immunoradiometric serum ferritin concentration compared
with stainable bone-marrow iron as indices to iron stores.
Clin. Chemistry 26: 145 (1980)
94. FRENKEL, E.J., B. van den BELD, B.W. KÜNIG, J.J.M. MARX:
Preparative isolation of distinct molecular forms of rab-
bit liver ferritin using high-performance liquid chromato-
graphy.
Analyt. Biochem. 135: 489 (1983)
95. FRENKEL, E.J., B. van den BELD, J.J. MARX:
Influence of heat-treatment on rabbit liver ferritin
kinetics.
Brit. J. Haematol. 55 (3): 449 (1983)
96. FRENKEL, E.J., B. van den BELD, B.A. van OOST, J.J. MARX:
Influence of heat treatment on rabbit liver ferritin.
Biochim. Biophys. Acta 745 (2): 202 (1983)
97. FREY, R., J. GRIMM, M. TRACHSLER, K. RHYNER:
Reliability of serum ferritin, serum iron and total iron
binding capacity in the differential diagnosis of micro-
cytic hypochromic anemia.
Schweiz. Med. Wschr. 112: 13 (1982)
98. GARRY, P.J. and J.H. SAIKI:
Idiopathic hemochromatosis: serum ferritin concentrations
during therapy by phlebotomy.
Clin. Chem. 28: 1806 (1982)
99. GHIELMI, S., G. PIZZOCOLO, C. IACOBELLO, A. ALBERTINI,
P. AROSIO:
Methodological effects on the quantitation of serum ferritin
by radio- and enzymeimmunoassays.
Clin. Chim. Acta 120: 285 (1982)
100. GOTO, Y., M. PATERSON, I. LISTOWSKY:
Iron uptake and regulation of ferritin synthesis by hepatoma
cells in hormone-supplemented serum-free media.
J. Biol. Chem. 258 (8): 5248 (1983)

101. GOURANTAN, J. and R. FOLLIOT:
Presence des cristaux de ferritine de grande taille dans les cellules de l'intestin moyen de *Campylenchia latipes* say.
Rev. Can. Biol. 27: 77 (1968)
102. GRAIL, A., G. BATES, A.M. WARD, W.G. JONES, B.W. HANCOCK:
Serum ferritin as a third marker in germ cell tumours.
Europ. J. Cancer Clin. Oncol. 18: 261 (1982)
103. GRAIL, A., B.W. HANCOCK, P.M. HARRISON:
Serum ferritin in normal individuals and in patients with malignant lymphoma and chronic renal failure measured with seven different commercial immunoassay techniques.
J. Clin. Pathol. 35: 1204 (1982)
104. GRANICK, S.:
Ferritin: increase of protein apoferritin in gastrointestinal mucosa as a direct response to iron feeding function of ferritin in regulation of iron absorption.
J. Biol. Chem. 164: 737 (1946)
105. GRANICK, S.:
Structure and physiological function of ferritin.
Physiol. Rev. 31: 489 (1951)
106. GREEN, R., L.R. WATSON, G.A. SAAB, W.H. CROSBY:
"Normal" serum ferritin - a caution.
Blood 50: 545 (1977)
107. GROPP, C., K. HAVEMANN, F.G. LEHMANN:
Carcinoembryonic antigen and ferritin in patients with lung cancer before and during therapy.
Cancer 42: 2802 (1978)
108. GROPP, C., K. HAVEMANN, F.G. LEHMANN:
Serum ferritin levels in patients with lung cancer before and during therapy and in comparison to CEA determinations.
In: LEHMANN, F.G. (Hrsg.), Carcino-Embryonic Proteins, Vol. II, Elsevier/North-Holland, Biomedical Press, 1979.
S. 451
109. GROPP, C., F.G. LEHMANN, H. BAUER, K. HAVEMANN:
Carcinoembryonic antigen, α_1 - fetoprotein, ferritin and α_2 - pregnancy associated glycoprotein in the serum of lung cancer patients and its demonstration in lung tumor tissues.
Oncology 34: 267 (1977)
110. GUILLEBAUD, J., M.D. BARNETT, Y.B. GORDON:
Plasma ferritin levels as an index of iron deficiency in women using intrauterine devices.
Brit. J. Obstet. Gynaecol. 86: 51 (1979)

111. GUILLEUX, F. and A. WAGNER:
A new radioimmunoassay of serum ferritin: use of ^{125}I -labeled human spleen antigen and a solid phase second antibody.
Int. J. Nucl. Med. Biol. 8: 17 (1981)
112. HÄLLGREN, R., A. TERENT, L. WIDE, K. BERGSTRÖM, G. BIRGE-GARD:
Cerebrospinal fluid ferritin in patients with cerebral infarction or bleeding.
Acta Neurol. Scand. 61: 384 (1980)
113. HALLIDAY, J.W., L.V. Mc KEERING, L.W. POWELL:
Isoferritin composition of tissues and serum in human cancers.
Cancer research 36: 4486 (1976)
114. HALLIDAY, J.W., U. MACK, L.W. POWELL:
Duodenal ferritin content and structure. Relationship with body iron stores in man.
Arch. Int. Med. 138: 1109 (1978)
115. HALLIDAY, J.W., A.M. RUSSO, J.L. COWLISHAW, L.W. POWELL:
Serum-ferritin in diagnosis of haemochromatosis.
Lancet II: 621 (1977)
116. HANCOCK, B.W., L. BRUCE, K. MAY, J. RICHMOND:
Ferritin, a sensitizing substance in the leucocyte migration inhibition test in patients with malignant lymphoma.
Brit. J. Haematol. 43: 223 (1979)
117. HANN, H.W., H.M. LEVY, A.E. EVANS:
Serum ferritin as a guide to therapy in neuroblastoma.
Cancer Res. 40: 1411 (1980)
118. HARRISON, P.M.:
The structure of apoferritin: molecular size, shape and symmetry from X-ray data.
J. Mol. Biol. 6: 404 (1963)
119. HARRISON, P.M., R.J. HOARE, T.G. HOY, I.G. MACARA:
Ferritin and haemosiderin: structure and function.
In: JACOBS, A., M. WORWOOD (Hrsg.), Iron in Biochemistry and Medicine, Acad. Press Inc., London 1974. S. 73
120. HAUSMANN, K., J. DREWS, R. TRAMPE, I. WEDEKIND, E. GÜLTNER, R. KUSE, J. DÜLLMANN:
Die Serumferritinbestimmung in der Diagnostik des Eisenmangels.
In: J.P. KALTWASSER, E. WERNER (Hrsg.), Serumferritin, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980. S. 104

121. HAZARD, J.T., P. ARIOSIO, J.W. DRYSDALE:
Selective Quantitation of "carcinofoetal" isoferritins in radioimmunoassay.
In: FISHMAN, W.H., St. SELL (Hrsg.), Onco-Developmental Gene expression, Acad. Press Inc. N.Y., S.Franc., London 1976. S. 749
122. HAZARD, J.T., J.W. DRYSDALE:
Ferritinaemia in cancer.
Nature 265: 755 (1977)
123. HAZARD, J.T., M. YOKOTA, P. ARIOSIO, J.W. DRYSDALE:
Immunologic differences in human isoferritins: implications for immunologic quantitation of serum ferritin.
Blood 49: 139 (1977)
124. HEINRICH, H.C.:
Normal serum ferritin-another caution.
Blood 51: 764 (1978)
125. HEINRICH, H.C.:
Falsely low normal values for serum ferritin?
Clin. Chem. 27: 768 (1981)
126. HENNEBERG, K.B., W. LUBOLDT:
Serumferritinuntersuchungen bei Blutspendern zur Frage des Spendeabstandes.
Infusionstherapie 1: 9 (1980)
127. HIJMAN, W., H.R. SCHUTT, F. KLEIN:
An immunofluorescence procedure for the detection of intracellular immunoglobulins.
Clin. Exp. Immunol. 4: 457 (1969)
128. HOFMANN, V., C. DESCOEUDRES, A. MONTADON, R.L. GALEAZZI, P.W. STRAUB:
Serum ferritin in renal failure, under hemodialysis and following renal transplant.
Schweiz. Med. Wschr. 108: 1835 (1978)
129. HOY, T.G. and A. JACOBS:
Ferritin polymers and the formation of haemosiderin.
Brit. J. Haematol. 49: 593 (1981)
130. HUNTER, W.M.:
Radioimmunoassay.
In: WEIR, D.M., Handbook of experimental immunology, 2nd Ed. Kap. 17. Publ. Blackwell Scientific Publ. Oxford/London/Edinburgh/Melbourne 1973
131. HUSSAIN, M.A.:
Value of serum ferritin estimation in sickle cell anaemia.
Arch. Dis. Childhd. 53: 319 (1978)

132. HUSSEIN, S., M. LAULICHT, A.V. HOFFBRAND:
Serum ferritin in megaloblastic anaemia.
Scand. J. Haematol. 20: 241 (1978)
133. HYDE, B.B., A.J. HODGE, A. KAHN, M.L. BIRNSTIEL:
Phytoferritin. I. Identification and localization.
J. Ultrastruct. Res. 9: 248 (1963)
134. IMAI, N., Y. UMEZAWA, Y. ARATA, S. FUJIWARA:
An electrochemical study of the iron storage protein,
ferritin.
Biochim. Biophys. Acta 626: 501, (1980)
135. ISHIKAWA, K., O. NARITA, H. SAITO, K. KATO:
Determination of ferritin in urine and in serum of normal
adults with a sensitive enzyme immunoassay.
Clin. Chim. Acta 123: 73 (1982)
136. ISHITANI, K., I. LISTOWSKI, J. HAZARD, J.W. DRYSDALE:
Differences in subunit composition and iron content of
isoferritins.
J. Biol. Chem. 250: 5446 (1975)
137. ISHITANI, K., Y. NIITSU, N. WATANABE, J. KOSEKI, J. OIKAWA,
Y. KADONO, T. ISHII, Y. GOTO, Y. ONODERA, I. URUSHIZAKI:
Clinical evaluation of serum ferritin for serodiagnosis
of cancer.
In: LEHMANN, F.G. (Hrsg.), Carcino-Embryonic Proteins, Vol.I,
Elsevier/North-Holland, Biomed. Press, 1979. S. 279
138. ITO, H., Y. TAGAKI, Y. ANDO, A. KUBO, S. HASHIMOTO,
F. TSUTSUI, S. KURIHARA:
Serum ferritin levels in patients with cervical cancer.
Obstet. & Gyn. 55: 358 (1980)
139. JACOBS, A.:
Do acidic isoferritins regulate haemopoiesis?
Brit. J. Haematol. 55 (2): 199 (1983)
140. JACOBS, A., B. JONES, C. RICKETTS, R.D. BULBROOK,
D.Y. WANG:
Serum ferritin concentration in early breast cancer.
Brit. J. Cancer 34: 286 (1976)
141. JACOBS, A., S.W. PETERS, E.R. BAUMINGER, J. EIKELBOOM,
S. OFER, E.A. RACHMILEWITZ:
Ferritin concentration in normal and abnormal erythrocytes
measured by immunoradiometric assay with antibodies to
heart and spleen ferritin and Mössbauer spectroscopy.
Brit. J. Haematol. 49: 201 (1981)
142. JACOBS, A., A. SLATER, J.A. WHITTAKER, G. CANELLOS,
P.H. WIERNIK:
Serum ferritin concentration in untreated Hodgkin's
disease.
Br. J. Cancer 34: 162 (1976)

143. JACOBS, P. and J. DOMMISSE:
The plasma ferritin level as a reliable index of body iron dextran.
J. Med. 13: 309 (1982)
144. JAKOBSEN, E., A. ENGESET, B. SANDSTAD, M. AAS:
Serum ferritin and bone marrow haemosiderin in patients with malignancies and in healthy controls.
Scand. J. Haematol. 28: 264 (1982)
145. JACOBSEN, G.K. and M. JACOBSEN:
Immunohistochemical demonstration of ferritin in various types of carcinomas.
In: Advances in cancer research (abstract book); International society for oncodevelopmental biology and medicine, XI annual meeting, Stockholm, Sweden, September 11-15, 1983
146. JONES, B.M. and M. WORWOOD:
An immunoradiometric assay for the acidic ferritin of human heart: Application to human tissues, cells and serum.
Clin. Chim. Acta 85: 81 (1978)
147. JONES, B.M., M. WORWOOD, A. JACOBS:
Serum ferritin in patients with cancer: determination with antibodies to HeLa cell and spleen ferritin.
Clin. Chim. Acta 106: 203 (1980)
148. JONES, B.M., M. WORWOOD, A. JACOBS:
Isoferritins in normal leucocytes.
Brit. J. Haematol. 55 (1): 73 (1983)
149. JONES, P.A.E., F.M. MILLER, M. WORWOOD, A. JACOBS:
Ferritinaemia in leukemia and Hodgkin's disease.
Br. J. Cancer 27: 212 (1973)
150. KALTWASSER, J.P.:
Diagnostische Bedeutung der Ferritin-Bestimmung im Serum.
bioscientia Nr. 14, Ingelheim 1979
151. KALTWASSER, J.P.:
Indikation zur Serumferritin-Bestimmung.
DMW 105: 319 (1980)
152. KALTWASSER, J.P.:
Serum-ferritin evaluation.
DMW 106: 1395 (1981)
153. KALTWASSER, J.P. und E. WEBNER:
Ferritin. Radioimmunological determination on serum and clinical significance.
Klin. Wschr. 55: 1103 (1977)
154. KALTWASSER, J.P. und E. WERNER:
Die Bedeutung des Serumferritins bei der Diagnose und Verlaufsbeobachtung des Eisenmangels.
Therapiewoche 28: 7301 (1978)

155. KALTWASSER, J.P. und E. WERNER:
Serumferritin als Kontrollparameter bei der Therapie des Eisenmangels.
In: J.P. KALTWASSER, E. WERNER (Hrsg.), Serumferritin,
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980. S. 137
156. KALTWASSER, J.P., E. WERNER, H. BECKER:
Serumferritin als Kontrollparameter bei oraler Eisentherapie.
DMW 102: 1150 (1977)
157. KANESHIGE, E.:
Serum ferritin as an assessment of iron stores and other
hematologic parameters during pregnancy.
Obstet. Gynecol. 57: 238 (1981)
158. KELLY, A.M., D.J. MACDONALD, A.N. McDOUGALL:
Observations on maternal and fetal ferritin concentrations
at term.
Brit. J. Obstet. Gyn. 85: 338 (1978)
159. KEW, M.C., J.D. TORRANCE, D. DERMAN, M. SIMON, G.M. MACNAB,
R.W. CHARLTON, I.H. BOIHWELL:
Serum and tumour ferritins in primary liver cancer.
GUT 19: 294 (1978)
160. KLITSCHKE, B., A.J. CLURANA, L. BERTRAND, J. SANY:
Serum ferritin levels for the evaluation of iron stores
in rheumatoid arthritis anaemia.
La nouv. presse med. 11: 3779, (1982)
161. KOEHN, H.D., G. WIDER, P.M. BAYER and A. MOSTBECK:
Ferritin, transferrin, and iron: relations in serum.
Clin. Chem. 26: 352 (1980)
162. KOLLER, M.E., I. ROMSLO, P.H. FINNE, F. BROCKMEIER,
I. TYSSERUDYN:
The diagnosis of iron deficiency by erythrocyte protoporphyrin
and serum ferritin analyses.
Acta paed. Scand. 67: 361 (1978)
163. KOLLER, M.E., I. ROMSLO, P.H. FINNE, B. HANEBERG:
Serial determinations of serum ferritin in children with
acute lymphoblastic leukemia.
Acta Paediatr. Scand. 68: 93 (1979)
164. KONIJN, A., B.S. BALIGA, H.N. MUNRO:
Synthesis of liver ferritin on free and membrane-bound
polycyribosomes of different sizes.
Fed. Europ. Biochem. Soc. Letters 37: 249 (1973)
165. KONIJN, A.M., N. CARMEL, R. LEVY, C. HERSHKO:
Ferritin synthesis in inflammation. II. Mechanisms of
increased ferritin synthesis.
Brit. J. Haematol. 49: 361 (1981)

166. KONIJN, A.M., R. TAL, R. LEVY, Y. MATZNER:
Isolation and fractionation of ferritin from human term placenta- a source for human isoferritins.
Analyt. Biochem. 144: 423 (1985)
167. KONTTINEN, Y.T., V. BERGROTH, K. KÄYHKÖ, S. REITAMO:
Human ferritin: effects of antigen source and fixation on leucocyte staining by immunoperoxidase technique.
Histochem. 75: 585 (1982)
168. LAMERZ, R.:
Ferritin-Bestimmung bei Lungen- und Ovarialtumoren.
Serumferritin-Symposium, Zusammenfassung der Referate, Frankfurt/Main, 13./14. Okt. 1978
169. LAMERZ, R.:
Serumferritinbestimmung bei Lungen- und Ovarialtumoren.
In: J.P. KALTWASSER, E. WERNER (Hrsg.), Serumferritin, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980. S. 233
170. LAMERZ, R. und A. FETEH-MOGHADAM:
Radioimmunologische Bestimmungen von Immunglobulin E.
Klin. Wschr. 52: 18 (1974)
171. LAMERZ, R., R. GIRG, H. HENNEKE, G. HORKA, E. SEGURA:
Immunological investigations in lung cancer.
In: LEHMANN, F.G. (Hrsg.), Carcino-Embryonic Proteins, Vol.II, Elsevier/North-Holland, Biomedical Press, 1979. S. 559
172. LANG, J.M., M. EBER, G. METHLIN, F. OBERLING:
Serum ferritin during the course of chronic myeloid leukemia-increase of serum ferritin as a marker of dyserythropoiesis.
Acta Haematol. 67: 145 (1982)
173. LAUFBERGER, V.:
Sur la cristallisation de la ferritin.
Bull. Soc. Chim. Biol. 19: 1575 (1937)
174. LAVOIE, D.J., K. ISHIKAWA, I. LISTOWSKY:
Correlations between subunit distribution, microheterogeneity, and iron content of human liver ferritin.
Biochemistry 17: 5448, (1978)
175. LAVOIE, D.J., D.M. MARCUS, S. OTSUKA, I. LISTOWSKY:
Characterization of ferritin from human placenta. Implications for analysis of tissue specificity and microheterogeneity of ferritins.
Biochim. Biophys. Acta 579: 359 (1979)
176. LINDER, M.C., J.R. MOOR, L.E. SCOTT, H.N. MUNRO:
Mechanism of sex difference in rat tissue iron stores.
Biochim. Biophys. Acta 297: 70 (1973)

177. LINDER, M.C., G.M. NAGEL, M. ROBOZ, D.M. HUNGERFORD:
The size and shape of heart and muscle ferritins analyzed
by sedimentation, gel filtration, and electrophoresis.
J. Biol. Chem. 256: 9104 (1981)
178. LINDER, M.C., WRIGHT, K., MADARA, J.:
Concentration, structure and iron saturation of ferritins
from normal human lung and lung tumors with graded histo-
pathology.
Enzyme 27: 189 (1982)
179. LINKESCH, W., P.AIGINGER, J. KÜHBÜCK:
Ferritin - ein tumorassoziiertes Protein bei Hodentumoren.
Der Nuklearmediziner 24: 379 (1980)
180. LIPSCHITZ, D.A., A. ALLEGRE, J.D. COOK:
The clinical significance of ferritinuria.
Blood 55: 260 (1980)
181. LUGER, T.A., W. LINKESCH, R. KNOBLER, E.M. KOKOSCHKA:
Serial determination of serum ferritin levels in patients
with malignant melanoma.
Oncology 40: 263 (1983)
182. LUNDIN, L., R. HÄLLGREN, G. BIRGEGERD, L. WIDE:
Serum ferritin in alcoholics and the relation to liver
damage, iron state and erythropoietic activity.
Acta Med. Scand. 209: 327 (1981)
183. LUSTBADER, E.D., H.W. HANN, B.S. BLUMBERG:
Serum ferritin as a predictor of host response to hepatitis
B virus infection.
Science 220: No. 4595: 423 (1983)
184. LUXTON, A.W., W.H. WALKER, J. GAULDIE, M.A. ALI, C. PELLETIER:
Radioimmunoassay for serum ferritin.
Clin. Chem. 23: 683 (1977)
185. MACARA, I.G., T.G. HOY, P.M. HARRISON:
The formation of ferritin from apoferritin.
Biochem. J. 126: 151 (1972)
186. MACARON, C.I. and Z.G. MACARON:
Increased serum ferritin levels in hyperthyroidism.
Ann. Internal Med. 96: 617 (1982)
187. MACK, U., L.W. POWELL, J.W. HALLIDAY:
Detection and isolation of a hepatic membrane receptor
for ferritin.
J. Biol. Chem. 258 (8): 4672 (1983)
188. MARCO-FRANCO, J.E., A. ALARCON, A. MOREY, C. PIZA,
J. BESTARD, S. MAIRATA, A. GALMES, M. DALMAU:
Serum ferritin in haemodialysis.
Nephron 32(1), 57 (1982)

189. MARCUS, D.M. and N. ZINBERG:
Isolation of ferritin from human mammary and pancreatic carcinomas by means of antibody immunoabsorbents.
Arch. Biochem. Biophys. 162: 403 (1974)
190. MARCUS, D.M. and N. ZINBERG:
Measurement of serum ferritin by radioimmunoassay: Results in normal individuals and patients with breast cancer.
J. Natl. Cancer Inst. 55: 791 (1975)
191. MARCUS, D.M., N. ZINBERG, I. LISTOWSKY:
Ferritin.
In: R.B. HERBERMAN, K.R. McINTIRE (Hrsg.), Immunodiagnosis of cancer, M. Dekker Inc. N.Y., Basel 1979. S. 473
192. MARESCAL, J.C., B. DUBLET, C. WUSTEFELD, G. CHARLIER, R.R. CRICHTON:
Immunological characteristics of human ferritins, consequences for human serum ferritin determination.
Clin. Chim. Acta 111: 99 (1981)
193. MARIANI, G., N. MOLEA, N. MAZZUCA, M. FRIA, P.M. MACCHIA, R. BIANCHI:
Normal values for serum ferritin in infants and children using a new radioimmunoassay system utilizing a solid-phase second antibody (Liso-phase).
J. Nucl. Med. All. Sci. 25: 125 (1981)
194. MASON, D.Y., C.R. TAYLOR:
Distribution of transferrin, ferritin and lactoferrin in human tissues.
J. Clin. Pathol. 31: 316 (1978)
195. MASOVER, W.H.:
Ultrastructural analysis of the disruption of ferritin by acetone.
In: BAILEY, G.W. (Hrsg.), 35th Ann. Proc. Electron Microscop. Soc. Amer. Boston 1977
196. MASOVER, W.H.:
Multiple isoforms in mouse liver. Demonstration by polyacrylamide gel electrophoresis.
Biochim. Biophys. Act. 532: 202 (1978)
197. MASOVER, W.H.:
The ultrastructure of ferritin macromolecules. III. Mineralized iron in ferritin is attached to the protein shell.
J. Mol. Biol. 123: 721 (1978)
198. MATZNER, Y., A.M. KONIJN, C. HERSHKO:
Serum ferritin in hematologic malignancies.
Am. J. Hematol. 9: 13 (1980)
199. MICALI, B., M.A. FLORIO, A. VENUTI, G. GIORGIANNI, F.P. SAIITA:
The significance of tumor marker assay in the staging of breast cancer. Assessment of ferritin and beta-HCG levels.
J. Nucl. Med. All. Sci. 25: 65 (1981)

200. MILLAR, J.A., R.L.C. CUMMING, J.A. SMITH, A. GOLDBERG:
Effect of actinomycin D, cycloheximide and acute blood
loss on ferritin synthesis in rat liver.
Biochem. J. 119: 643 (1970)
201. MILMAN, N., T.E. CHRISTENSEN, N. STRANDBERG PEDERSEN,
J. VISFELDT:
Serum ferritin and bone marrow iron in non-dialysis,
peritoneal dialysis and hemodialysis patients with chronic
renal failure.
Acta Med. Scand. 207: 201 (1980)
202. MILMAN, N., N. STRANDBERG PEDERSEN, J. VISFELDT:
Serum ferritin in healthy Danes: relation to marrow haemo-
siderin iron stores.
Dan. Med. Bull. 30(2): 115 (1983)
203. MIRAHMADI, K.S., W.L. PAUL, v. NUYS, R.L. WINER, N. DABIR-
VAZIRI, B. BYER, J.T. GORMAN, S.M. ROSEN:
Serum ferritin level.
JAMA 238: 601 (1977)
204. MORITA, R., M. YOSHII, K. NAKAJIMA, T. KOHSAKA, M. MIKI,
K. TORIZUKA:
Clinical evaluation of serum ferritin to iron ratio in
malignant diseases.
Europ. J. Nucl. Med. 6: 331 (1981)
205. MOROZ, C., GILER, S., KUPFER, B., URCA, I.:
Lymphocytes bearing surface ferritin in patients with
Hodgkin's disease and breast cancer.
New Engl. J. Med. 296: 1172 (1977)
206. MÜLLER-WIEFEL, D.E., F. BRENDLEIN, J. EHRLICH, W.E. BRANDEIS,
K. SCHARER:
Serumferritin bei Kindern mit Störungen der Eisenbilanz.
Helv. Paed. Acta 37: 245 (1982)
207. MUFTI, G.J., T.J. HAMBLIN, J. STEVENS:
Basic iso ferritin and hypercalcaemia in renal cell carcinoma.
J. Clin. Pathol. 35: 1008, (1982)
208. MUNRO, H.N. and M.C. LINDER:
Ferritin: Structure, biosynthesis, and role in iron meta-
bolism.
Physiological Reviews 58 (2): 317 (1978)
209. MYAGKAYA, G.L. and W.C. De BRUIJN:
X-ray microanalysis of cellular localization of ferritin
in mammalian spleen and liver.
MICRON 13: 7 (1982)
210. NERI, B., T. COMPARINI, S. GUIDI, S. PIERI, M. TOMMASI:
Ferritin as a chronobiological marker in immunoprolifera-
tive disease.
Oncology 40: 111 (1983)

211. NIITSU, Y., Y. KOHGO, S. OHTSUKA, N. WATANABE, J. KOSEKI, K. SHIBATA, K. ISHITANI, T. NAGAI, Y. GOCHO, I. URUSHIZAKI:
Ferritins in serum and tissue and their implications in malignancy.
In: FISHMAN, W.H., St. SELL (Hrsg.), Onco-Developmental Gene Expression, Academic Press Inc. N.Y., S. Franc., London, 1976. S. 757
212. NIITSU, Y. and I. LISTOWSKY:
The distribution of iron in ferritin.
Arch. Biochem. Biophys. 158: 276 (1973)
213. NITTI, D., C. FABRIS, G. DEL FAVERO, R. FARINI, F. GRASSI, A. FARINI, U. BACCAGLIN, S. PEDRAZZOLI, A. PICCOLI, M. LISE, R. NACCARATO:
Serum ferritin in pancreatic disease.
Digestion 25: 258 (1982)
214. OERTEL, J.:
Serum ferritin in differential diagnosis of anemia.
Klin. Wschr. 60: 571 (1982)
215. OERTEL, J., B.M. BOMBIK, M. STEPHAN, H. GERHARTZ:
Ferritin in bone marrow and serum in iron deficiency and iron overload.
Blut 37: 113 (1978)
216. OERTEL, J. und H. GERHARTZ:
Die Ferritinkonzentration im Serum bei verschiedenen Typen der Eisenmangelanämie.
DMW 102: 1147 (1977)
217. OERTEL, J., E. SCHULTZ, E. KORINTH, A. HEILHECKER:
Serumferritin in patients with malignant lymphomas.
Klin. Wschr. 55: 1109 (1977)
218. OERTEL, J., M. STEPHAN, M. KASTNER:
Localization and characteristics of ferritin in human bone marrow.
Acta Haematol. 67: 73 (1982)
219. OOST, van B.A., F.L. WILLEKENS, B.R. van NEERBOS, B. van den BELD:
Implications of using different tissue ferritins as anti-gens for ferritin in serum: four radioimmunoassay kits compared.
Clin. Chem. 28: 2429 (1982)
220. ORDER, S.E., KLEIN, J.L., LEICHNER, P.K.:
Antiferritin IgG antibody for isotopic cancer therapy.
Oncology 38: 154 (1981)
221. OHTSUKA, S. and I. LISTOWSKY:
High-resolution preparative electrochromatography for purification of two subunit types of ferritin.
Analyt. Biochem. 102: 419 (1980)

222. OTSUKA, S., I. LISTOWSKI, Y. NIITSU, I. URUSHIZAKI:
Assembly of intra- and interspecies hybrid apoferritins.
J. Biol. Chem. 255 (13): 6234 (1980)
223. OTSUKA, S., H. MARUYAMA, I. LISTOWSKY:
Structure, assembly, conformation, and immunological properties of the two subunit classes of ferritin.
Biochemistry 20: 5226 (1981)
224. OUCHTERLONY, Ö.:
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.
Progress in Allergy 5: 1 (1958)
225. PAGÉ, M., J. LAGUEUX, C. GAUTHIER:
A three step purification procedure for human liver ferritin.
Can. J. Biochem. 58: 494 (1980)
226. PAGE, M., L. THERIAULT, M. CARON:
Serum ferritin in the evaluation of leukemia patients and its synthesis in cell culture.
In: LEHMANN, F.G., (Hrsg.), Carcino-embryonic Proteins II, Elsevier/North-Holland, Biomed. Press, 1979. S. 455
227. PAPENHAUSEN, P.R., E.E. EMESON, C.B. CROFT, B. BOROWIECKI:
Ferritin-bearing lymphocytes in patients with cancer.
Cancer 53 (2): 267 (1984)
228. PARRY, D.H., C. RICKETTS, A. JACOBS:
Serum ferritin during unmaintained remission in acute lymphoblastic leukaemia.
Brit. Med. J. 2: 1341 (1978)
229. PENDERS, T.J., H.H. De ROOIJ-DIJK, B. LIEJNSE:
Rapid isolation of ferritin by means of ultracentrifugation.
Biochim. Biophys. Acta 168: 588 (1968)
230. PETER, F. and St. WANG:
Serum iron and total iron-binding capacity compared with serum ferritin in assessment of iron deficiency.
Clin. Chem. 27: 276 (1981)
231. PETERS, S.W., A. JACOBS, E. FITZSIMONS:
Erythrocyte ferritin on normal subjects and patients with abnormal iron metabolism.
Brit. J. Haematol. 52: 211, (1983)
232. PHARMACIA:
Sephacrose 2B - 4B - 6B in Perlform.
Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Sweden 1969
233. PHARMACIA:
Protein A-Sepharose CL-4B.
For cell surface and immunoglobulin studies.
Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden 1975

234. PHARMACIA:
Sephadex. Gel filtration in theory and practice.
Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden 1975
235. PHARMACIA:
Affinity chromatography. Principles and methods.
Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden 1977
236. PIEDRAS, J., M. CORDOVA, C. PEREZ-TORAL, E. LINE,
J. GARCA-FLORES:
Predictive value of serum ferritin in anemia development
after insertion of T Cu 220 intrauterine device.
Contraception 27 (3): 289 (1983)
237. PILON, V.A., P.J. HOWANITZ, J.H. HOWANITZ, N. DOMRES:
Day-to-day variation in serum ferritin concentration in
healthy subjects.
Clin. Chem. 27: 78 (1981)
238. POOTRAKUL, P., V. VONGSMASA, P. LA-ONPANICH, P. WASI:
Serum ferritin levels in Thalassemias and the effect of
splenectomy.
Acta Haematol. 66: 244 (1981)
239. PORTER, F.S.:
The effect of iron content on the behavior of human ferritin
in an inhibition-type radioimmunoassay.
J. Lab. Clin. Med. 83: 147 (1974)
240. POWELL, L.W., E. ALPERT, K. ISSELBACHER, J.W. DRYSDALE:
Human isoferritins: Organ specific iron and apoferritin
distribution.
Brit. J. Haematol. 30: 47 (1975)
241. PRICE, D., J.G. JOSHI:
Ferritin - a zinc detoxicant and a zinc ion donor.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 79: 3116 (1982)
242. PRICE, D.J., J.G. JOSHI:
Ferritin. Binding of beryllium and other divalent metal
ions.
J. Biol. Chem. 258 (18): 10873 (1983)
243. PURO, D.G. and G.W. RICHTER:
Ferritin synthesis by free and membrane bound (poly)riboso-
mes of rat liver.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 138: 399 (1971)
244. QVIST, I., A. NORDEN, T. OLOFSSON:
Serum ferritin in the elderly.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 40: 609 (1980)
245. REDMAN, C.M.:
Biosynthesis of serum proteins and ferritin by free and
attached ribosomes of rat liver.
J. Biol. Chem. 244: 4308 (1969)

246. REEVES, W.B., F.I. HAURANI:
Clinical applicability and usefulness of ferritin measurements.
Ann. Clin. Lab. Sci. 10: 529 (1980)
247. REISSMAN, K.R. and M.R. DIETRICH:
On the presence of ferritin in peripheral blood of patients with hepatocellular disease.
J. Clin. Invest. 35: 588 (1956)
248. RICHTER, G.W.:
Comparison of ferritin from neoplastic and non-neoplastic human cells.
Nature 207: 616 (1965)
249. RICHTER, G.W.:
Serological specificity of antibodies to protein subunits of horse spleen ferritin.
Biochim. Biophys. Acta 257: 471 (1972)
250. RICHTER, G.W., G.F. WALKER:
Reversible association of apoferritin and molecules: comparison of light-scattering and other data.
Biochemistry 6: 2871 (1967)
251. RODBARD, D. and Y. FELDMAN:
Kinetics of two-site immunoradiometric ("sandwich") assay. I. Mathematical model for simulation, optimization and curve fitting.
Immunochem. 15, No. 2: 71 (1978)
252. ROSSIELLO, R., M.N. CARRIERO, G.G. GIORDANO:
Distribution of ferritin, transferrin and lactoferrin in breast carcinoma tissue.
J. Clin. Pathol. 37 (1): 51 (1984)
253. ROTHEN, A.:
Ferritin and apoferritin in the ultracentrifuge.
J. Biol. Chem. 152: 679 (1944)
254. RUSSELL, S.M., P.M. HARRISON, S. SHINJO:
Discrete bands in ferritin electrofocusing.
Brit. J. Haematol. 38: 296 (1978)
255. SAAB, G.A., R. GREEN, W.H. CROSBY:
Serum and liver isoform differences: Evidence that serum ferritin may be underestimated in hyperferritinemia.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 161: 444 (1979)
256. SACHS, L.:
Statistische Auswertungsmethode.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1968)
257. SARCIONE, E.J., J.R. SMALLEY, L. STUTZMAN:
Increased ferritin synthesis and release by Hodgkins disease peripheral blood lymphocytes.
Int. J. Cancer 20: 339 (1977)

258. SARCIONE, E.J., L. STUTZMAN, A. MITTELMAN:
Ferritin synthesis by splenic tumor tissue of Hodgkin's disease.
Experienta 31: 1334 (1975)
259. SCETTINI, F., A. MAUTONE, L. CAVALLO, M. ALTOMARE, O. MONTAGNA, L. DELL'EDERA:
Delayed decrease in serum ferritin in polytransfused children with *Thalassemia major* after continuous subcutaneous infusions of desferrioxamine.
Acta Haematol. 66: 96 (1981)
260. SHNEERSON, J.M. and B.M. JONES:
Ferritin, finger clubbing, and lung disease.
Thorax 36: 688 (1981)
261. SHUMAN, H. and A.P. SOMLYO:
Energy-filtered transmission electron microscopy of ferritin.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA Biol. Sci. 79: 106 (1982)
262. SIIMES, M.A., J.E. ADDIEGO, P.R. DALLMAN:
Ferritin in serum: diagnosis of iron deficiency and iron overload in infants and children.
Blood 43: 581 (1974)
263. SIIMES, M.A. and P.R. DALLMAN:
New kinetic role for serum ferritin in iron metabolism.
Brit. J. Haemat. 28: 7 (1974)
264. SIIMES, M.A., W.C. WANG, P.R. DALLMAN:
Elevated serum ferritin in children with malignancies.
Scand. J. Haematol. 19: 153 (1977)
265. SINDIC, C.J., D. COLLET-CASSART, C.L. CAMBIASO, P.L. MASSON, E.C. LATERRE:
The clinical relevance of ferritin concentration in the cerebrospinal fluid.
J. Neurol., Neurosurg., and Psych. 44: 329 (1981)
266. SOUROUJON, M., A. ASHKENAZI, M. LUPO, S. LEVIN, E. HEGESH:
Serum ferritin levels in celiac disease.
Amer. J. Clin. Pathol. 77: 82 (1982)
267. SUCHANEK, E., V. MAYER, S. DODIG:
Newborn and maternal serum ferritin and iron levels.
Clin. Chem. News 2: 97 (1982)
268. TANAKA, M. and K. KATO:
The measurement of ferritin in the leukemic blasts with a "sandwich" type enzyme immunoassay method.
Cancer 51: 61 (1983)
269. TAYLOR, D.J., C. MALLIN, N. McDOUGALL, T. LIND:
Serum ferritin in women of reproductive age.
Brit. J. Obstet. Gynaecol. 89: 1000 (1982)

270. TAYLOR, D.J., C. MALLIN, N. McDOUGALL, T. LIND:
Effect of iron supplementation on serum ferritin levels
during and after pregnancy.
Brit. J. Obstet. Gynaecol. 89: 1011 (1982)
271. THEIL, E.:
Amphibian red blood cell ferritin.
J. Biol. Chem. 248: 622 (1973)
272. THOMSON, A.B., R. BRUST, M.A. ALI, M.J. MANT, L.S. VALBERG:
Iron deficiency in inflammatory bowel disease: Diagnostic
efficacy of serum ferritin.
Amer. J. Digest. Dis. 23: 705 (1978)
273. TIDMARSH, G.F., P.E. KLEBBA, L.T. ROSENBERG:
Rapid release of iron from ferritin by siderophores.
J. Inorganic Biochem. 18: 161 (1983)
274. TRUMP, B.F., J.M. VALIGORSKY, A.U. ARSTILA, W.J. MERGNER,
T.D. KINNEY:
The relationship of intracellular pathways of iron meta-
bolism to cellular iron overload and the iron storage
diseases.
Am. J. Pathol. 72: 295 (1973)
275. URUSHIZAKI, I., Y. NIITSU, K. ISHITANI, M. MATSUDA, M. FUKUDA:
Microheterogeneity of horse spleen ferritin and apoferritin.
Biochim. Biophys. Acta 243: 187 (1971)
276. VAN DER WEYDEN, M.B., H. FONG, L. HALLAM, M.J. BREIDAHN:
A rapid and simple assay for human erythrocyte ferritin.
Clin. Chim. Acta 127: 397 (1983)
277. VICENTE, V., M. GONZALEZ, A. LOPEZ BORRASCA:
Cerebrospinal fluid levels beta₂ microglobulin and ferritin
in lymphoproliferative disorders.
Acta Paediatr. Scand. 71: 325 (1982)
278. VIDNES, A.:
A single site serum ferritin immunoradiometric assay -
a comparison between serum and liver ferritin standards and
two antibody preparations.
Clin. Biochem. 15: 252 (1982)
279. VIDNES, A. and P.K. OPSTAD:
Serum ferritin in young men during prolonged heavy physical
exercise.
Scand. J. Haematology 27: 165 (1981)
280. VULIMIRI, L., N. CATSIMPOOLAS, A.L. GRIFFITH, M.C. LINDER,
H.N. MUNRO:
Size and charge heterogeneity of rat tissue ferritins.
Biochem. Biophys. Acta 412: 148 (1975)

281. VYVER, F.L. van de, P.P. BLOCKX, W. BLEYS, L. MUYLLE:
Ten commercial kits for the determination of serum ferritin compared by use in chronic hemodialysis patients.
Clin. Chem. 29 (5): 994 (1983)
282. WAGSTAFF, M., M. WORWOOD, A. JACOBS:
Properties of human tissue isoferritins.
Biochem. J. 173: 969 (1978)
283. WAGSTAFF, M. M. WORWOOD, A. JACOBS:
Biochemical and immunological chracterization of ferritin from leukaemic cells.
Brit. J. Haematol. 45: 263 (1980)
284. WAHREN, B., E. ALPERT, P. ESPOSTI:
Multiple antigens as marker substances in germinal tumors of the testis.
J. Natl. Cancer Inst. 58: 489 (1977)
285. WATANABE, N. and J. DRYSDALE:
Evidence for distinct mRNAs for ferritin subunits.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 98: 507 (1981)
286. WATANABE, N., Y. NIITSU, J. KOSEKI, J. OIKAWA, Y. KADONO, T. ISHII, Y. GOTO, Y. ONODERA, I. URUSHIZAKI:
Ferritinemia in nude mice bearing various human carcinomas.
In: LEHMANN, F.G. (Hrsg.), Carcino-Embryonic Proteins, Vol. I, Elsevier/North Holland, Biomed. Press, 1979
287. WEIPPL, G.:
Die Serumferritinbestimmung im Kindesalter.
In: J.P. KALTWASSER, E. WERNER (Hrsg.), Serumferritin, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980. S. 185
288. WERNER, E. und J.P. KALTWASSER:
Nachweisverfahren zur Serumferritinbestimmung.
In: J.P. KALTWASSER, E. WERNER (Hrsg.), Serumferritin, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, S. 34
289. WETZ, K. und R.R. CHRICHTON:
Ferritin. Struktur, Funktion und medizinische Aspekte.
Blut XXVII: 275 (1973)
290. WHEBY, M.S.:
Effect of iron therapy on serum ferritin levels in iron-deficiency anemia.
Blood 56: 138 (1980)
291. WOHLLENBERG, H., N. PANITZ, W. WACHECK:
Hypoferraemia and serum ferritin.
Dtsch. Med. Wschr. 105: 1527 (1980)

292. WORWOOD, M., M. WAGSTAFF, B.M. JONES, S.J. CRAGG:
Eigenschaften des Serumferritins.
In: J.P. KALTWASSER, E. WERNER (Hrsg.), Serumferritin,
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980. S. 25
293. WORWOOD, M., S.J. CRAGG, A.M. WILLIAMS, M. WAGSTAFF,
A. JACOBS:
The clearance of ^{131}I -Human plasma ferritin in man.
Blood 60: 827 (1982)
294. WORWOOD, M., S. DAWKINS, M. WAGSTAFF, A. JACOBS:
The purification and properties of ferritin from human
serum.
Biochem. J. 157: 97 (1976)
295. YODA, Y and T. ABE:
Acute monocytic leukemia cell isoferritin.
Cancer 46: 289 (1980)
296. YOSHINO, Y., Y. HIRAI, T. AOKI, T. MORITA, Y. EGUCHI,
T. YAJIMA, Y. KAGAWA:
Serum ferritin concentration and isoferritin patterns
detected by immunoradiometric assay.
J. Nutr. Sci. Vitaminol. 26: 87 (1980)
297. ZÄHRINGER, J.:
Struktur und Funktion von Ferritin.
In: J.P. KALTWASSER, E. WERNER (Hrsg.), Serumferritin.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980, S. 1
298. ZÄHRINGER, J., B.S. BALIGA, H.N. MUNRO:
Novel mechanism for translational control in regulation of
ferritin synthesis by iron.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 857 (1976)
299. ZUCKER, S., S. FRIEDMAN, R.M. LYSIK:
Bone marrow erythropoiesis in the anemia of infection,
inflammation, malignancy.
J. Clin. Invest. 53: 1132 (1974)
300. ZUYDERHOUDT, F.M., C. LINTHORST, G.G. JÖRNING, N.C. LADIGES,
A.M. BRUGMAN:
Influence of liver isoferritin profile on quantitative
measurement of total ferritin protein in human liver,
with emphasis on iron overload.
Ann. Clin. Biochem. 20: 80 (1983)

L E B E N S L A U F

13. August 1960 geboren in Kaufbeuren

Schulbildung

1967 - 1969	Grundschule in der Hallstraße, Augsburg
1969 - 1971	Grundschule am roten Tor, Augsburg
1971 - 1973	Holbein-Gymnasium, Augsburg
1973 - 1980	Staatl. Gymnasium, Marktoberdorf
1980	Abitur

Studium

1980 - 1986 Studium der Medizin an der
Ludwig-Maximilian-Universität München

Praktisches Jahr an folgenden Lehr-
krankenhäusern:

- Medizinische Poliklinik d. Universität
- Chirurg. Abteilung am Zentralklinikum
Augsburg
- Augenklinik der Universität

30. Okt./26. Nov.
1986 Drittes Staatsexamen

Dissertation

Nov. 1982 - Experimentelle Arbeit an der Medizi-
Nov. 1984 nischen Klinik II im Klinikum
Großhadern

Als Verfasser bedanke ich mich bei allen Personen und Institutionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Das Thema für die vorliegende Arbeit wurde mir von Herrn Prof. Dr. med. Rolf Lamerz, Oberarzt der medizinischen Klinik II am Universitätsklinikum Großhadern, gestellt. Für seinen engagierten Beistand in fachlicher, wie in menschlicher Hinsicht und seine allzeitige Bereitschaft zu kritischen wissenschaftlichen Diskussionen bin ich ihm zu besonderem Dank verpflichtet.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. G. Paumgartner, Direktor der medizinischen Klinik II am Klinikum Großhadern, für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit an seinem Institut. Für die Überlassung von Tumormaterial und histologische Begutachtung gebührt Herrn Chefarzt Prof. Dr. med. E. Kugel (Chirurgische Abteilung am Krankenhaus München-Harlaching) und Herrn Chefarzt Prof. Dr. med. B. Stampfl (Pathologische Abteilung am Krankenhaus München-Harlaching) mein aufrichtiger Dank, ebenso Herrn Prof. Dr. med. O. Richter (Direktor der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum Großhadern) und seinem Oberarzt, Herrn Prof. Dr. med. H. Welsch für den Bezug reifer Plazenten.

Für die freundliche Zusendung von Referenz-Plazentaferitin und entsprechenden Antiseren sowie eines polyklonalen Antiserums gegen menschliches Herzferitin danke ich Herrn Dr. med. H. Bohn von der Fa. Behringwerke in Marburg und Herrn Dr. M. Worwood (Department of Haematology, University of Wales, Cardiff). Für wertvolle verfahrenstechnische Hinweise und Unterstützung danke ich Herrn G. Spöttl, chemisch-technischer Assistent an der medizinischen Klinik II im Klinikum Großhadern.

